

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA



**ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO DE LA TRANSMISIÓN
SINÁPTICA INHIBITORIA
EN EL COMPLEJO BASOLATERAL AMIGDALINO
DE LA RATA**

Rosa María Pérez Grande

2016



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**DEPARTAMENTO DE
FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA**

Los abajo firmantes, Drs. Javier Yajeya Pérez y José María Criado Gutiérrez, miembros del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “Estudio electrofisiológico de la transmisión sináptica inhibitoria en el Complejo Basolateral Amigdalino de la rata”, ha sido realizado bajo su dirección, por Dña. Rosa María Pérez Grande, y consideran que reúne las condiciones necesarias de calidad y rigor científico para su exposición pública y defensa con el fin de optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Salamanca, 11 de diciembre de 2015

Fdo.

Dr. Javier Yajeya Pérez

Fdo.:

Dr. José María Criado Gutiérrez

AGRADECIMIENTOS

Quiero en primer lugar expresar mi agradecimiento a mis directores de Tesis, por su apoyo incondicional y su paciencia a lo largo de todo este tiempo.

A Javi por estar siempre ahí a la hora de los registros y de los análisis. Sin su ayuda hubiera sido muy difícil culminar este trabajo.

A Adela y a Marga por su ánimo y ayuda facilitándome mi integración en el laboratorio.

A Laura y a Mar por su paciencia y cariño.

Especialmente quiero agradecer a Jose Mary su fe en mi y su esfuerzo por sacar adelante esta Tesis.

INDICE	Pag
1.- INTRODUCCIÓN.....	5
1.1.- La amígdala.....	6
1.1.1.- Organización funcional.....	6
1.1.2.- Mecanismos de Neurotransmisión en el Complejo amigdalino.....	16
1.1.3.- Implicaciones Funcionales de la Amígdala.....	20
1.2.- Complejo basolateral amigdalino (BLA).....	24
1.2.1.- Conexiones del BLA	30
1.2.2.- Implicaciones Funcionales del BLA	34
2.- PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....	39
2.1.- Planteamiento	40
2.2.- Objetivos.....	41
3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
4.- RESULTADOS.....	60
4.1. Caracterización electrofisiológica de las células registradas.....	61
4.2.- Caracterización morfológica de las células registradas.....	65
4.3.- Respuestas en el BLA a la estimulación en cápsula externa y en el núcleo lateral amigdalino.....	67
4.4.- Componente Excitatorio de las Respuestas de las Neuronas del BLA a la Estimulación en EC/LA.....	69
4.5.- Estudio de la neurotransmisión inhibitoria de las neuronas en BLA por la estimulación de EC/LA.....	71
4.6.- Actividad inhibitoria espontánea IPSP.....	72
4.7.- Efectos del carbacol sobre el potencial de membrana.	75
4.8.- Efectos del carbacol sobre la respuesta postsináptica inhibitoria	75
4.9.-Caracterización del subtipo de receptor muscarínico que media la modulación que el carbacol induce en la respuesta inhibitoria	78
5.- DISCUSIÓN.....	81
6.- CONCLUSIONES.....	95
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	98
8.- ABREVIATURAS.....	125

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- LA AMIGDALA

1.1.1 Organización Funcional

La amígdala es una estructura subcortical del sistema límbico compuesta por una serie de núcleos situados en la porción antero-ventral del lóbulo temporal del cerebro de los primates. También se la denomina complejo amigdalino y en las distintas especies animales se encuentra en diferentes localizaciones. Así, en los marsupiales está en el suelo del asta temporal de los ventrículos laterales, mientras que en la mayoría de los mamíferos está situada por delante del asta temporal de los ventrículos laterales.

El término “amígdala” fue utilizado por primera vez por Burdach a principios del siglo XIX, para describir la existencia de una masa de sustancia gris en forma de pera a la que también denominó núcleo amigdalino (Fig.1). Cincuenta años más tarde el examen microscópico de sus cortes histológicos del lóbulo temporal, revelaron la existencia de diferencias estructurales en la misma (Swanson y Petrivich, 1998).

La amígdala está compuesta por numerosos núcleos de neuronas, agrupados principalmente en un complejo basolateral (incluyendo los núcleos basomediales), y los núcleos central y cortical-medial, estando tanto anatómica y como funcionalmente intercalada entre el procesamiento emocional y motivacional (cortical), y la respuesta somática periférica. De esta manera, estructuras especialmente importantes para las funciones emocionales y motivacionales alcanzan la amígdala que posee vías de salida que contribuyen a la creación de una serie de circuitos córtico-subcorticales, que proporcionan

una parte importante del sustrato anatómico para la elaboración respuestas funcionales, en las que la amígdala, como decimos, integraría la información correspondiente del procesamiento del componente emocional, mediando en su traducción posterior a la hora de elaborar la respuesta somática o conductual adaptativa correspondiente (Heimer, 1969; Nieuwenhuys y cols. 2009).

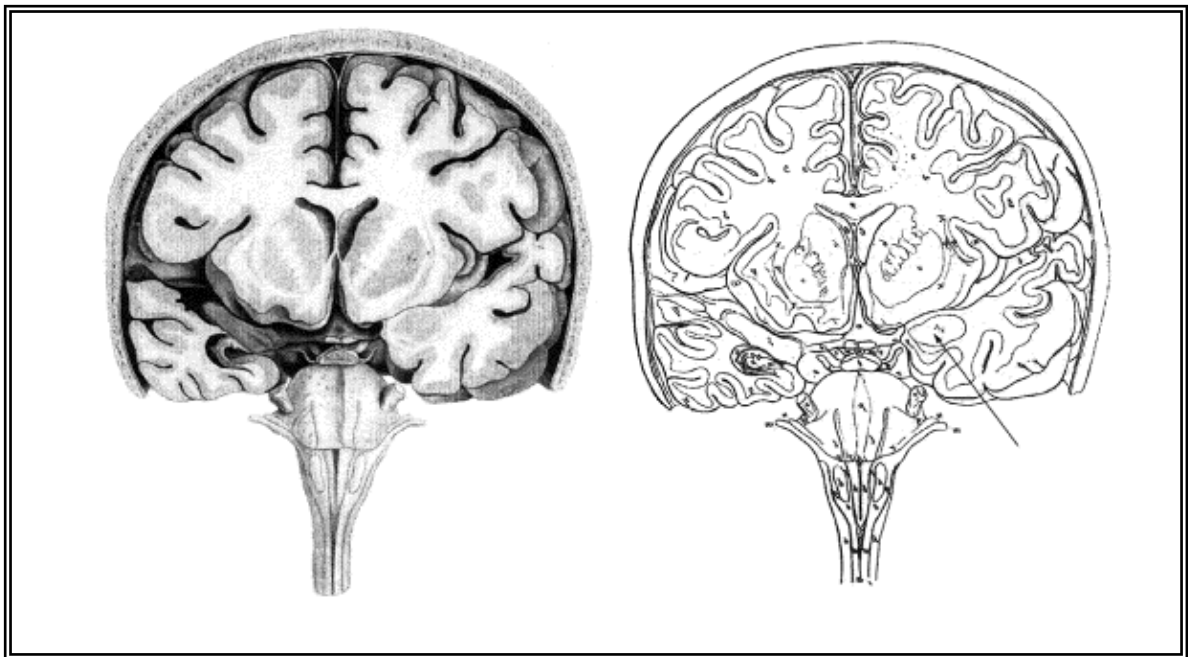


Fig 1.- Primera ilustración del núcleo amigdalino (Mandelkern), en el hemisferio cerebral en humanos. Una flecha añadida a la figura de la derecha indica el núcleo amigdalino tal y como lo dibujó Burdach

Uno de los problemas que se plantean a la hora de describir el sistema amigdalino es el hecho de que los distintos núcleos que lo componen no son celularmente homogéneos ni en el tamaño, ni en la forma de sus células. Así, la utilización de técnicas de impregnación con Golgi ha revelado la existencia en el complejo amigdalino de tres tipos de células: a) células estrelladas, b) células *tipo* piramidales y c) células piramidales modificadas (McDonald, 1992; Roberts, 1992; Carlsen y Heimer, 1988).

La composición celular del grupo lateral, basal y cortical es similar, así como las zonas mediales del área amigdalina anterior. El núcleo lateral, además, contiene células muy pequeñas que no se encuentran en otros núcleos amigdalinos (Isaacson, 1974).

Sin embargo y a pesar de que la amígdala tenga orígenes embriológicos heterogéneos, las diferentes divisiones amigdalinas en las distintas especies animales muestran una organización histoquímica y topográfica en la que se incluye un conjunto de intrincadas conexiones intraamigdalinas, lo que sugiere que la amígdala no es un concepto arbitrario sino un verdadero sistema funcional cuyo fisiología va comprendiéndose mejor de día en día (Martínez García y cols., 2002).

La organización del complejo amigdalino y sus conexiones ha sido tema de intenso debate en la última década del pasado siglo XX, tanto en relación con la nomenclatura y con el número de núcleos que lo constituyen, como con su clasificación. Johnston (1923), en estudios ya considerados clásicos, dividió el complejo amigdalino en dos grandes porciones, una *centromedial* y otra *córtico-basolateral*. La porción centromedial, constituida por el núcleo central y el medial e está íntimamente relacionada con el estriado. Es la porción más antigua desde el punto de vista ontogénico y filogénico. La porción córtico-basolateral, está formada por los núcleos cortical y basolateral en íntima asociación con la corteza cerebral. Este autor también observó que el núcleo centromedial tenía extensiones que proyectaban rostralmente a través de la estría terminal hacia el núcleo del lecho de la estría continuando por esta vía. Este concepto de Johnston de “una amígdala multicompartamental” en relación a la organización estructural y funcional de la amígdala ha dominado hasta finales del siglo XX.

Posteriormente y con el fin de establecer una mejor correlación entre la división nuclear y las conexiones de cada núcleo amigdalino, se han propuesto algunas

modificaciones en la nomenclatura de los núcleos de la amígdala tanto en la rata como en el gato. Price (1981) describió en la rata un núcleo medial con tres subdivisiones, anteroventral, posterodorsal y parte principal o cuerpo del núcleo, un núcleo basolateral con dos subdivisiones, una anterior y otra posterior, y un núcleo basomedial.

Por otro lado, Swanson y Petrovich (1998) propusieron que la amígdala era una suma de estructuras anatómicas diferentes y no relacionadas entre sí. Estos autores sugirieron que el término “amígdala” debería ser abandonado porque sus componentes pertenecen a sistemas funcionales diferentes. Este criterio fue seguido por otros autores, basándose sobretodo en estudios de expresión génica (Álvarez-Bolado y cols., 1995, 1996).

Posteriormente se ha sugerido que la amígdala no es una entidad neurobiológica aislada, sino que debería concebirse en términos más amplios, como una región constituida por varias y distintas estructuras, cada una relacionada con diferentes sistemas y estando íntimamente relacionadas entre sí unas con otras (McDonald 2003).

En la actualidad, se asume que para que la amígdala lleve a cabo la diversidad de funciones en las que está implicada, necesita una amplia gama de conexiones con otras estructuras del sistema nervioso central (SNC), tanto aferentes como eferentes, y una compleja red de interconexiones internas entre los distintos núcleos que la constituyen.

En este sentido, numerosos estudios describen cómo la amígdala está conectada prácticamente con la totalidad del encéfalo, lo que habla a favor de su papel integrador en el procesamiento emocional. Así, las aferencias procedentes del tálamo Ottersen (1981) y la corteza, tanto límbica como extralímbica, llegan principalmente al complejo basolateral (Vertes, 2004; Song, 2015; Moyer, 2015). El núcleo central recibe su aferencia mayoritaria del sistema autónomo central (red autónoma central integrada por hipotálamo, sustancia

gris periacueductal, núcleo dorsal del rafe, núcleo parabraquial, locus coeruleus, núcleo solitario, área reticular ponto-bulbar, y sus proyecciones aferentes y eferentes (Norgren, 1976; Záborszky. 1977; Post, 1980; Rizvi, 1991; Hoover, 2011; Reppucci, 2015). Por su parte, al núcleo cortical llegan aferentes por la estría olfatoria lateral (Scalia, 1875; Niu, 2012).

Los núcleos del tracto olfatorio forman parte del complejo corticomedial que está además formado por los núcleos central, medial y cortical, así como por el área de transición cortico-amigdalina. Esta amígdala corticomedial recibe un importante contingente de fibras procedentes del bulbo olfatorio, a través de la cintilla olfatoria lateral. También recibe aferencias hipotalámicas y de los núcleos talámicos de la línea media. Estas fibras entran en la amígdala por sus tractos eferentes que constituyen el mayor contingente de fibras de la estría terminal. Sus fibras alcanzan los núcleos septales y el hipotálamo, esencialmente en áreas de éste que son de carácter sexual (Armstrong, 1991).

La eferencia amigdalina fundamental se dirige principalmente desde el núcleo central, hacia el hipotálamo lateral y el núcleo paraventricular (a través de las vías amigdalófugas ventral y dorsal, y de la estría terminal), lo que apoya su implicación en procesos relacionados con la conducta visceral, con el control de la ingesta de alimentos, mediante una acción moduladora por inhibición o facilitación del hipotálamo lateral. Además y mediante sus proyecciones descendentes, sobre todo las procedentes del núcleo central, colabora con el hipotálamo en el control del sistema nervioso autónomo, durante las respuestas conductuales concretas (como elevación de la presión arterial, cambios en la motilidad intestinal, etc.). Efecto que alcanza a través de de una conexión directa por el fascículo longitudinal dorsal, al propio sistema nervioso autónomo central. Todas estas conexiones se establecen en ambas direcciones (de ida y vuelta) con regiones encefálicas

como el estriado adyacente o el mesencéfalo rostral, dando lugar a la respuesta somática correspondiente (Heimer, 1969; Kamali, 2015).

Es importante destacar que la amígdala, además de las aferencias corticales que vehiculan información emocional de los estímulos del entorno (en general excitadoras), recibe también influencias prefrontales y orbitofrontales de carácter inhibitorio, que participan en la modulación del patrón de descarga del complejo amigdalino (Rosenkranz, 2001; Tessitore, 2002; Hoover, 2011).

La función de coordinación emocional que ejerce la amígdala se encuentra regulada asimismo por otros sistemas de control que actúan en paralelo. De esta forma, la vía dopaminérgica meso-límbica (procedente del mesencéfalo rostral: área tegmental ventral y sustancia negra) atenúa la inhibición que la corteza prefrontal ejerce sobre la amígdala, liberando su aferencia sensorial, y con ello la percepción emocional, especialmente de estímulos relacionados con la ira y el miedo (alterándose por tanto en casos de depleción dopaminérgica, como en la enfermedad de Parkinson) (Swanson, 1982; Rosin y cols., 1992; Deutch, 1993).

Más en concreto, se ha descrito que la amígdala modula la elaboración de respuestas de tipo emocionales tanto innatas como aprendidas. Las respuestas innatas vendrán determinadas por la aferencia autonómica hipotálamo-troncoencefálica al núcleo central amigdalino, desde donde se organizará de manera directa la respuesta somática correspondiente. Por otro lado, la existencia de una compleja conectividad interna en la amígdala entre los distintos núcleos amigdalinos, permite a este complejo nuclear asociar respuestas autónomas simples con respuestas conductuales muy elaboradas, al poner en relación estadios de procesamiento troncoencefálico, diencefálico y telencefálico,

equilibrando el conjunto de aferencias excitatorias e inhibitorias con las necesidades homeostáticas del medio interno (Cowan, 1965).

Por otro lado, la amígdala participa también de los sistemas neurales que subyacen en los procesos de aprendizaje de tipo asociativo, dando lugar a la formación de memoria implícita (Morgan y LeDoux, 1999), al permitir la vinculación de estímulos condicionados, que pueden ser procesados tanto a nivel cortical como talámico (generando respuestas a más corta latencia, que pueden ser útiles en situaciones de peligro) con respuestas somáticas previamente relacionadas con estímulos no condicionados. En este sentido, un ejemplo de la participación del complejo amigdalino en el aprendizaje asociativo y la formación de memoria implícita es el caso del miedo aprendido (tanto el miedo condicionado simple como reacciones de sobresalto potenciadas por el miedo), mecanismo similar al que se pone en marcha en el ser humano en los estados de ansiedad (McGaugh 1989; Quirk et al. 1995; Maren, 1996; Gründemann, 2015).

Un modelo de alteración en la función amigdalina es el que aparece en la enfermedad de Urbach-Wiethe. Esta enfermedad consiste en un trastorno degenerativo que se acompaña de un depósito de calcio en la amígdala. En esta enfermedad se produce de forma característica un déficit en la capacidad para reconocer los signos emocionales en la expresión facial, aunque se conserve la capacidad discriminativa consciente de la identidad facial. Dentro de la información visual de una cara, existen determinados datos complejos portadores de una mayor carga emocional (por ejemplo, la dirección de la mirada), que son analizados por áreas de la corteza temporal inferior, diferentes del área del reconocimiento de la identidad (cuya alteración daría lugar a una prosopagnosia), que se proyectan a la amígdala. De esta manera, lesiones de este componente aferente, o en su caso del mismo núcleo amigdalino, alteran la capacidad de reconocimiento y respuesta adecuada ante el

contenido emocional de un rostro. Dada la importancia que posee la expresión facial en nuestro desarrollo social, las alteraciones en este sistema de procesamiento llevan como consecuencia a un déficit importante de cognición social (Newton y cols., 1971; Staut y Naidich, 1998; Siebert, 2003).

En líneas generales, puede decirse que la lesión amigdalina da lugar a una incapacidad para generar frente al entorno una respuesta emocional inconsciente (respuesta somática), especialmente cuando el estímulo va cargado de componente emocional lo que constituye el miedo (Kandel, 2013). Pero además, la amígdala interviene de en otras formas de respuesta como placer y otras reacciones apetitivas, teniendo en cuenta que la alteración, por lesión de la misma, que produce a la hora de asociar información sensorial ambiental con aspectos tanto gratificantes como no gratificantes de un estímulo determinado. Un ejemplo de ello lo vemos en el síndrome de Klüver-Bucy, en el que la hiperoralidad puede estar relacionada con una pérdida de la capacidad discriminativa de las características gratificadoras de los objetos visuales, lo que les lleva a explorarlos gustativamente de forma indiscriminada. También el condicionamiento contextual, por el que un organismo tiende a aumentar la exposición y el contacto con entornos en los que encontró gratificación en el pasado, ejemplifica el papel de la amígdala en el procesamiento de estímulos emocionales de carácter gratificante (Torras, 1981).

Además, posiblemente, la amígdala no sólo regule el componente autónomo eferente de las respuestas conductuales simples y condicionadas, sino que intervenga en el procesamiento del recuerdo mismo generado a partir del procesamiento emocional y del aprendizaje, aunque en el almacenamiento de este tipo de memoria implícita participan también y de una manera fundamental otras áreas, principalmente corticales como son el cíngulo y el giro parahipocampal. Estructuras estrechamente vinculadas con la propia amígdala. Los experimentos llevados a cabo a este sentido por Morgan y LeDoux (1999)

apoyaron la existencia de sistemas anatómicos diferenciados implicados en el almacenamiento de tanto de recuerdos conscientes como inconscientes del procesamiento emocional, dependiendo los primeros de determinadas instancias corticales (corteza prefrontal) y de la amígdala, y los segundos dependiendo de otras áreas corticales (como los mencionados cíngulo y giro parahipocampal). El patrón de conectividad de la amígdala con la corteza extra-límbica actúa en todo caso de manera bidireccional, de tal forma que esta estructura parece participar también en el procesamiento consciente de la información emocional. Este procesamiento explícito emplea en parte un sistema de transmisión beta-adrenérgico, cuyo bloqueo dificulta el recuerdo consciente de estímulos ambientales y escenarios cargados emocionalmente (Cahill, 2003).

Así pues, la lesión amigdalina ocasiona no sólo una descoordinación entre el procesamiento consciente y el inconsciente de la información de un estímulo emocional, sino que además da lugar a la pérdida de recuerdos emocionales, y a una incapacidad para expresar somáticamente la respuesta autónoma correspondiente, vehiculada en condiciones normales por este nivel subcortical del procesamiento emocional.

Otros estudios de lesión inducen a pensar en que la lesión de esta zona amigdalina podría dar lugar a una alteración de estas funciones relacionadas con la olfacción y respuestas sexuales, lo que justifican teniendo en cuenta la localización de la amígdala dentro de la vía olfatoria y por sus proyecciones hacia las áreas sexuales dimórficas del hipotálamo (Devor, 1973; Cherry, 1999; Ayoub, 2013). Sin embargo, se ha observado que la lesión bilateral de la amígdala no altera el sentido del olfato, ni genera modificaciones en la conducta sexual si no va acompañada de la lesión de la corteza piriforme (Stacey, 1983). Por otra parte Estudios en los que la estimulación o lesión de la amígdala provoca cambios conductuales, como reacciones de ira (en el caso de estimulación) y de temor o docilidad (en el caso de destrucción), pero cuando la lesión es bilateral suele ponerse de manifiesto

una especie de ceguera psíquica que justifica el papel de la amígdala como centro integrado en los circuitos mnésicos (Delgado y cols. 1998).

Por último, lesiones o anormal funcionamiento de la amígdala o de alguno de sus núcleos aparecen en humanos en varias enfermedades como es la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia, en estados de depresión, de adicción o en trastornos generados por estrés postraumático. (Cannon y cols. 1999; Lawrie y Abukmel, 1998; Wright y cols., 2007, 2000; Harrison 1999; Maier y cols., 2000; Trimble, 1991; Kanemoto y cols, 1996; Slater y cols., 1963; Quirk y Gehlert 2003; LaBar y LeDoux 1996;; Yilmazer-Hanke, 2015; Veer y cols. 2015; Huang y cols., 2015; Van Mierlo, 2015).

En raras ocasiones se manifiesta el síndrome de Kluver-Bucy en forma completa en humanos tras lesiones de amígdala, aunque si se observa torpeza en la de la capacidad de respuesta emocional. Estos descubrimientos, junto con las alteraciones en el comportamiento emocional que aparece en ciertas enfermedades neurológicas en la existe afectación de la amígdala y en la enfermedad de Alzheimer, apoyan el papel de la del complejo amigdalino en los procesos emocionales. Algunos autores, han encontrado similitudes entre los síntomas de inadaptación social que aparecen en monos tras una lesión del lóbulo temporal, y algunos de los síntomas deficitarios que aparecen en la esquizofrenia (Zola-Morgan y cols. 1991; Kromer y cols. 1990; Kirkpatrick y Buchanan 1990).

1.1.2.- Mecanismos de Neurotransmisión en el Complejo Amigdalino

Estudios bioquímicos y de inmunofluorescencia han revelado la existencia de los principales neurotransmisores en la amígdala de diversas especies animales incluido en primates, así como su distribución (Fallon y cols., 1981; Björklund y Lind Vall, 1984; Hökefel y cols., 1984 a y b; Fallon y Loughlin, 1985; Price y cols., 1987; Amaral, 1992).

La mayoría de los autores señalan, que la actividad colinérgica, determinada mediante *colinacetiltransferasa*, se encuentra en su mayor parte en los núcleos amigdalinos lateral y basal. (Ben-Ari y cols., 1977; Saavedra y cols., 1974). El origen de esta innervación colinérgica en la amígdala se ha localizado en neuronas de la *sustancia innominada* (Fibiger, 1982; Nagai y cols., 1982) y en menor grado en el área preóptica lateral. Pero sobre todo la amígdala recibe una importante innervación colinérgica que procede del *núcleo basal magnocelular de Meynert*, en concreto de su parte anterolateral, que alcanzan los núcleos basal y basal accesorio, el área amigdalohipocámpica y el núcleo de la cintilla olfatoria lateral (Mesulam y cols., 1983).

También se han descrito en la amígdala proyecciones noradrenérgicas procedentes sobre todo del *locus coeruleus* (con alguna contribución de los grupos celulares tegmentarios laterales), así como innervación dopaminérgica del área tegmental ventral, *la sustancia negra pars compacta* y la extensión caudal de sustancia negra en el mesencéfalo. (Fallon y cols., 1978; Meibach y Katzman, 1981; Fallon y Philippe, 1992). El núcleo central, los núcleos intercalados y la corteza periamigdalina muestran los niveles más altos de inmunorreactividad a dopamina- β -hidroxilasa, mientras los núcleos más profundos contienen pocas fibras noradrenérgicas (Sadikot y Parent, 1990).

Los núcleos dorsales del *rafe*, y en menor medida también los mediales, constituyen el origen de la innervación serotoninérgica de la amígdala, (More y cols., 1978; Bobiller y cols., 1979.; Parnt y cols., 1981) que discurre por el fascículo prosencefálico medial junto con proyecciones noradrenérgicas (Mehler, 1980). Los plexos más densos inmunorreactivos a la serotonina se hallan en los núcleos lateral, basal parvocelular y magnocelular, basal accesorio magnocelular y central, así como en el área amigdalohipocámpica.

El estudio de la distribución del ácido γ -amino butírico (GABA) y su enzima glutamato descarboxilasa (GAD), demuestra que la mayor parte de la inmunoreactividad se encuentra en el núcleo central seguido por el núcleo medial (Ben-Ari, 1981) y el área amigdalina anterior, con niveles más bajos en los núcleos basal accesorio, basal y lateral. Además se encuentran cuerpos celulares GAD- o GABA-inmunorreactivos en todos los núcleos amigdalinos, sobre todo en los núcleos basal, lateral y cortical, siendo probable que estos núcleos den lugar a una importante red de plexos terminales GABAérgicos en el complejo amigdalino (Otterson y cols., 1987).

Se han encontrado también niveles altos de reactividad al GAD en la estría terminal. Estudios de lesión realizados tanto de la estría terminal como en la vía amigdalofugal ventral no afectaron a las estructuras amigdalinas, lo que sugiere que la innervación GABAérgica de la amígdala es fundamentalmente *intrínseca*. (Ben-Ari, 1981).

En cuanto a la sustancia P, han sido detectadas neuronas inmunorreactivas a la misma en los núcleos amigdalinos medial y central (Ljünahl y cols., 1978) y se ha demostrado su presencia en el haz amigdalofugal y estría terminal (Sakanak y cols., 1981).

Se ha demostrado la presencia de células y fibras inmunorreactivas a la somatostatina así como su distribución en el núcleo lateral, basal y central con variaciones

tanto intra como internucleares (Amaral y cols., 1989). El estudio se ha realizado utilizando anticuerpos policlonales a distintos fragmentos de prosomatostatina en la amígdala del mono (Amaral y cols., 1992).

El neuropéptido Y tiene una distribución muy similar a la de la somatostatina, lo que refleja el fuerte grado de coexistencia de ambos péptidos en muchas neuronas centrales (Hendry y cols., 1984; Amaral y cols. 1992).

El núcleo medial de la amígdala contiene fibras y cuerpos celulares inmunorreactivos a la vasopresina (Café y cols. 1989; Sofoniew 1985) encontró que la “amígdala media” recibe proyecciones que contienen vasopresina/neurofisisina desde el *núcleo supraquiasmático*, mientras la “amígdala central” recibe fibras procedentes del *núcleo paraventricular* hipotalámico.

El núcleo central amigdalino parece ser la única región del sistema límbico que contiene diferentes péptidos opioides (Haber y Elde, 1982; Inagaki y Parent, 1985; Sadikot y cols., 1988). Algunas fibras encefalinérgicas parecen proyectar a través de la estría terminal. Por lo general, se han encontrado pocas neuronas o fibras relacionadas con opioides. En los núcleos medial y central de la amígdala se observan cantidades apreciables de inmunoreactividad para β -endorfina, que al parecer procede de neuronas inmunorreactivas a la pro-opiomelanocortina del *hipotálamo mediobasal*.

Además, los núcleos medial y central presentan aferentes con hormona liberadora de corticotrofina, que parecen proceder, en gran parte, del núcleo paraventricular hipotalámico. La distribución de neuronas peptidérgicas en el núcleo del lecho de la estría terminal es similar a la del núcleo central.

Un dato característico de ciertas partes del complejo amigdalino es la presencia de gran número de receptores para hormonas esteroideas y de neuronas que concentran dichas hormonas (Pfaff y cols., 1976). Así, los núcleos corticales medial, basal accesorio y posterior contienen numerosas neuronas con importantes concentraciones de estrógenos en su interior, mientras que las neuronas que concentran dihidrotestosterona se encuentran sobre todo en el núcleo medial, así como en los núcleos basal accesorio, basal parvocelular y lateral.

También existe un alto nivel de actividad de las enzimas 5^a-reductasa, que convierte la testosterona en 5^a-dihidrotestosterona no aromatizable, y aromatasas que convierten la testosterona y la androstendiona en estradiol (Michael y Rees, 1982).

La presencia de este sistema de neuronas con actividad química sobre los esteroides en ciertas partes de la amígdala sugiere que algunas de sus funciones, pueden ser considerablemente afectadas por los cambios en la situación endocrina.

1.1.3.- Implicaciones Funcionales de la Amígdala

A lo largo de la historia se han realizado numerosos estudios, utilizando diferentes tipos de técnicas, con el fin de definir las características funcionales de este grupo nuclear.

Así, se ha demostrado que la estimulación eléctrica amigdalina tiene efectos muy variados sobre la actividad del sistema nervioso. Gloor (1955, 1960) llegó a la conclusión de que la amígdala podía actuar como moduladora de las funciones autónomas, endocrinas y conductuales del hipotálamo. Esta teoría ha sido posteriormente apoyada por otros autores (Egger, 1967; Murphy y cols., 1968; Oomura y cols., 1970). Entre las respuestas moduladoras provocadas por la estimulación del complejo amigdalino se describen: a) Alteraciones en el sistema nervioso autónomo, que se manifiestan como modificaciones en la profundidad y frecuencia de la respiración, variaciones en la motilidad gastrointestinal y uterina, en la frecuencia cardíaca, piloerección, dilatación pupilar, salivación y micción (Cornish y Hall, 1979). b) Respuestas motoras, en forma de posturas, gestos y desplazamientos (Shealy y Peele, 1957; Delgado-García y Mir, 1974). c) Respuestas endocrinas, con variaciones en los niveles de actividad de las glándulas adrenales, hipófisis, tiroides y gónadas (Velasco y Taleisnik, 1971; Martín y cols., 1973; Carrillo y cols., 1977). d) Cambios en la conducta, con reacciones de amenaza, huida o agresión; y por otro lado, de acercamiento (Fernández de Molina y Hunsperger, 1959, 1962; Kaada, 1972; Halgren, 1981).

Dentro del efecto que la amígdala tiene sobre las distintas formas de conducta, debe mencionarse la importancia que tiene esta estructura sobre la ingestión de agua y alimentos. La estimulación eléctrica o química del núcleo cortical y área amigdalina anterior facilita la ingesta, mientras que se obtienen efectos contrarios cuando se estimula el núcleo basolateral (Miñano y cols. 1992).

Experimentos electrofisiológicos realizados tanto a nivel unitario como intracelular han confirmado la compleja influencia amigdalina sobre las diversas áreas a las que proyecta. El tipo de respuesta obtenida depende entre otros parámetros, del núcleo amigdalino estimulado y de la frecuencia de estimulación (Gloor, 1955; Fernández de Molina y Ruiz Marcos, 1967; Dreifuss y Murphy, 1968; Oomura y cols., 1970; Dreifuss, 1972; Fernández de Molina y cols., 1974; Sturn y cols., 1976).

Experimentos de lesión o ablación de la amígdala tanto total como parcial, han permitido una mejor evaluación de la significación funcional de la misma. La ablación bilateral total de la amígdala no afecta de forma notable la actividad somática, autónoma o endocrina del animal; pero en cambio, la conducta global del mismo se altera gravemente (Gloor, 1972). La amigdalectomía es la causa principal del síndrome de Kluber y Buzy (1937), descrito por dichos autores, y que surge como consecuencia de la ablación del lóbulo temporal en monos (Richardson, 1973; Aronson y Cooper, 1979; Masco y Carrer, 1980; Aggleton y Passingham, 1981; Thomson, 1981). Los animales amigdalectomizados se comportan como si hubiesen perdido la capacidad de interpretar señales exteriores, es decir, los estímulos no generan la respuesta emocional adecuada, por lo que decrece la reacción de evitación a estímulos aversivos (Ursin, 1965; Pellegrino, 1968; Kaada, 1972; Coover y cols., 1973; Werka y cols., 1978).

Estudios realizados en pacientes con epilepsia de lóbulo temporal suministran evidencia adicional de que los mecanismos emocionales están representados en el lóbulo temporal y se localizan preferentemente en estructuras profundas del mismo, en especial la amígdala. Las respuestas emocionales producidas durante la fase de crisis epilépticas, o evocadas por estimulación eléctrica amigdalina en enfermos bajo anestesia local y con electrodos implantados crónicos (Penfield y Mullan, 1959; Gastaut, 1952; Bente y Kluge, 1953), han aportado más evidencias para considerar que el lóbulo temporal, en concreto la

amígdala, contiene estructuras que cuando son excitadas pueden generar una respuesta emocional, en las que se incluyen miedo, rabia, así como ansiedad y placer. Estas observaciones, apoyan la idea de que los mecanismos motivacionales implicados en determinados tipos de conducta como la conducta de evitación, tienen una mayor representación en la amígdala que en el neocortex temporal.

De esta forma, la amígdala es considerada como la estructura que posibilita el enlace de los sistemas perceptuales con los sistemas de elaboración, expresión y experiencia de la emoción. Es en ella donde se produciría la integración del significado afectivo de los datos sensoriales en la situación ambiental del momento presente en que se perciben, con la experiencia pasada del individuo.

El interés por el papel de la amígdala en procesos de memoria ha ido aumentando a lo largo de estos últimos años. Diversos autores basándose en el hecho de que los procesos de aprendizaje están influenciados por los estados emocionales, han sugerido que la amígdala actuaría sobre ellos al mediar el estado emocional. A partir de esta sugerencia, ha propuesto que la amígdala codifica, almacena y recoge atributos emocionales positivos y negativos de recuerdos específicos (Halgren y cols., 1980; Kesner, 1981, 1982; Baker y cols., 1982; Liang y cols., 1982, 1983; Phelps, 2004).

Experimentos realizados mediante técnicas de estimulación han demostrado que tanto la amígdala como el hipocampo intervienen en diversos procesos de aprendizaje. Douglas y Pribram (1966), demostraron que la estimulación eléctrica del hipocampo o de la amígdala produce alteraciones en la retención de tareas de evitación pasiva y de condicionamiento del tipo aversivo (Goddard, 1964; Pellegrino, 1965; Kesner y Doty, 1968; Lidsky y cols., 1970; Lidsky y Slotnick 1971; McDonough y Kesner, 1971; Bresnahan y Routtenberg, 1972, Yajeya y cols., 1991). Estudios más recientes realizados

en primates han demostrado que la lesión combinada de amígdala e hipocampo produce defectos graves en la retención de tareas de discriminación visual y táctil (Mishkin, 1978; Mishkin y Aggleton, 1981; Murria y Mishkin, 1983), en cambio la ablación bilateral de una u otra estructura produce solamente un ligero déficit. Se ha sugerido que dichas lesiones podrían ser la causa del síndrome amnésico que presentan algunos pacientes tras el padecimiento de ciertas afecciones cerebrales que afectan a estas estructuras.

Las lesiones bilaterales del lóbulo temporal en humanos, producen déficits muy característicos (Scoville, 1954; Scoville y Milner, 1957; Penfield y Milner, 1958; Brierly y cols., 1960). Los acontecimientos vividos por el paciente después de la lesión cerebral son fácilmente olvidados, mientras que el recuerdo de los acontecimientos ocurridos antes de la lesión permanece intacto. Este profundo déficit de la memoria anterógrada, se extiende a varios tipos de información sensorial y se la conoce con el nombre de amnesia global.

Bower (1967) y Underwood (1969) propusieron que la memoria de un acontecimiento específico está compuesta por una colección de atributos, cada uno de los cuales representa una característica del acontecimiento. Teniendo en cuenta esta visión multidimensional de la memoria, los experimentos de ablación combinada del hipocampo y amígdala realizados en monos por Kesner y Ardí (1983), Cross y Goodman (1982), Zola-Morgan y cols. (1982), sugieren que la amígdala y el hipocampo pueden tener diferentes funciones en los procesos de memoria. El hipocampo tendría un papel fundamental en la codificación, almacenamiento y recogida de atributos temporo-espaciales dentro de un concepto ambiental, y la amígdala actuaría sobreañadiendo los atributos emocionales.

1.2.- EL COMPLEJO BASOLATERAL AMIGDALINO (BLA).

El complejo basolateral amigdalino es un área subcortical heterogénea que está presente en todos los mamíferos, estando particularmente desarrollado y diferenciado en humanos. Johnston (1923) definió al complejo basolateral amigdalino como una estructura que se continúa con la corteza piriforme en la región de la fisura amigdaloides. De hecho, la parte posterior del núcleo basal aparece como un pliegue interno de la corteza que se continúa lateralmente con la corteza piriforme y caudalmente con la corteza entorrinal en mamíferos no primates. Comprende los núcleos lateral, basal y accesorio del basal del complejo amigdalino (Price y cols., 1987).

Esta parte de la amígdala se encuentra en estrecha relación con el neocórtex temporal. La amígdala basolateral no recibe fibras directas del bulbo olfatorio pero sí indirectas a través de la corteza piriforme y tiene fuertes relaciones con sistemas neocorticales.

Como ya hemos expuesto en el apartado anterior, la amígdala recibe abundantes aferencias de todas las modalidades sensoriales (Jones y Powel, 1970; Aggleton y cols., 1980; Van Hoesen, 1981), pudiendo ser considerada como el eslabón intermedio en el procesamiento cortical de la información sensorial que pasa al hipotálamo. Pues bien, estudios electrofisiológicos (Ben-Ari y col., 1974; Prelevic y cols., 1976) han demostrado que la mayoría de las aferencias corticales terminan en el complejo basolateral amigdalino, modulando la descarga de las neuronas amigdalinas.

El complejo basolateral se corresponde con la región originalmente llamada amígdala por Burdach e identificada por Meynert y otros autores en el siglo pasado como la prolongación temporal del claustró, en base a consideraciones embriológicas y sus relaciones topográficas en el adulto lo que se conoce en la actualidad como “núcleos basal y lateral” y es el más problemático en cuanto a su clasificación. En la actualidad, se acepta que el grupo nuclear basolateral está constituido por los núcleos basal, lateral y basal accesorio (Price y cols., 1987).

El núcleo lateral, como su nombre indica, es el situado más lateralmente. Está limitado por la cápsula interna que lo separa de las formaciones corticales laterales, excepto en su polo caudal, donde limita con el putamen y el asta anterior del ventrículo lateral. Más medialmente el núcleo lateral está separado del núcleo basal por fibras del “haz lateral” y su polo rostral está rodeado por el núcleo paralaminar. La extensión lateral del núcleo paralaminar y la sustancia blanca subamigdalina forman el límite ventral del mismo. Estudios realizados en monos, y basándose fundamentalmente en métodos de tinción de Nissl y de acetilcolinesterasa, revelaron la subdivisión dorsomedial. Esta es una zona que se tiñe débilmente para la acetilcolinesterasa, y la división ventrolateral en la que aparecen células más densamente teñidas (agrupadas) y con una fuerte expresión de colinesterasa. (Price y cols., 1987; Amaral y Bassett, 1989; Amaral y cols., 1992). De forma general, el material teñido con Nissl en este núcleo está compuesto por células de pequeño a mediano tamaño que se tiñen moderadamente, y sobre todo, más claras que el núcleo basal adyacente.

El núcleo basal es el núcleo más grande de la amígdala en monos. Está separado del núcleo lateral mediante fibras del “haz lateral” y del basal accesorio por el “haz intermedio”. Se extiende casi hasta el límite ventral amigdalino y se separa de la sustancia blanca subamigdalina por el núcleo paralaminar. La nomenclatura y los límites del núcleo

basal han ido variando hasta nuestros días. La terminología moderna comienza con Johnston (1923), quien define al mismo como “parte lateral del núcleo basal amigdalino y de células grandes”. Fue Lauer (1945) quien subdividió al núcleo basal en dos partes: (1) una situada dorsal y lateralmente y contiene células grandes (que corresponde a la división magnocelular de Price y cols., 1987) y (2) otra parte situada más ventral y medialmente, y que contiene células pequeñas (equivalente a la división parvocelular de Price y cols., 1987). Otra variante terminológica refiere como “lateral basal” o “basolateral” a la división magnocelular del núcleo basal y como “medial basal” o “basomedial” a la parvocelular. Algunos estudios bioquímicos, utilizan el término general de “núcleo basolateral” refiriéndose a la totalidad de los núcleos profundos amigdalinos.

El núcleo basal accesorio es el más medial entre los núcleos amigdalinos profundos y se localiza aproximadamente 1mm en posición caudal en relación al polo rostral amigdalino, continuándose casi hasta el polo caudal amigdalino. Lateralmente está limitado por el núcleo basal, del cual se separa por el “haz intermedio” y medialmente por la corteza periamigdalina y el núcleo del tracto olfatorio lateral.

Price y cols. (1987) describieron básicamente dos divisiones principales del mismo: Las porciones magnocelular y parvocelular. La porción parvocelular esta compuesta por pequeñas células con marcaje claro y débilmente teñidas tanto en preparaciones de AChE y ChAT. La división magnocelular consta de células de tamaño mediano y grande teñidas más oscuramente con técnicas de Nissl que los de la porción parvocelular. Además esta división contiene marcadores colinérgicos que se definen desde niveles moderados a muy altos. (Amaral y cols., 1992).

Citoarquitecturalmente el complejo basolateral ha sido estudiado en muchas especies mediante técnicas histológicas e inmunocitoquímicas. A partir de estos estudios, se ha

determinado su organización neuronal y los componentes estructurales fundamentales de este complejo amigdalino, demostrándose que todas las porciones de la amígdala basolateral tienen tipos celulares semejantes. (McDonald y Culberson, 1982; McDonald, 1984; Millhouse y De olmos, 1983). En el análisis de Golgi de amígdala de gatos, (Hall, 1972), demostró que el núcleo basolateral amigdalino exhibía dos tipos de células fundamentales:

1. Células espinosas piramidales (Células tipo P).
2. Células estrelladas de escasa espinas (Células de tipo S).
3. Un tercer tipo en que se incluyen varias subpoblaciones .

Estas células eran muy semejantes a las neuronas piramidales y no piramidales de la corteza respectivamente. Estudios posteriores han revelado que la ultraestructura, sinaptología y la inmunocitoquímica de las neuronas piramidales y no piramidales eran muy parecidas a sus semejantes corticales. (McDonald, 1992; Roberts, 1992; Carlsen y Heimer, 1988). Sin embargo, las dendritas apicales amigdalinas no están ordenadas paralelamente entre sí. Estos dos tipos de neuronas fueron encontradas en todas las especies estudiadas, incluyendo el oposum, ratas, gatos, monos y humanos (McDonald, 1997).

El tipo de célula predominante es una neurona con soma en forma piramidal o piriforme de diferente tamaño y que exhibe una o dos dendritas apicales gruesas y varias dendritas basales más finas. (Corresponde al tipo P de las células de Hall, 1972; así como a las neuronas tipo I de McDonald y Culberson, 1981; y de las neuronas piramidales de Millhouse y De olmos,1983).

Los axones de estas neuronas salen del cuerpo celular o porción proximal de la dendrita primaria mostrando la presencia de varias espinas y normalmente dan colaterales

que se modifican moderadamente en la vecindad del soma y contactan con el soma de origen o con las de células vecinas.

Un segundo tipo celular corresponde a neuronas situadas entre las células piramidales en todas las porciones de la amígdala basolateral. Son neuronas pequeñas, ovoideas, se caracterizan por poseer dendritas con escasas espinas y axones que salen del soma y dando colaterales más o menos distales y conformando una arborización cerca de la célula de origen (Se corresponden con las células S de Hall, (1972,b); y con las neuronas tipo II de McDonald y Cuberson, (1981, 1982; McDonald 1997). Este tipo de neuronas puede ser clasificado como multipolar o bipolares dependiendo del patrón de ramificación dendrítico.

Además de estos dos tipos celulares, pueden ser identificadas otros diferentes tipos de subpoblaciones neuronales, ya que exhiben características axonales y dendríticas distintas. Este grupo de células incluye células araña, neurogliaforme, cono y neuronas extendidas.

Las células araña, se han observado en el núcleo basolateral amigdalino del opossum (McDonald y Cuberson, 1981) y de la rata (McDonald, 1982). Se caracterizan por la presencia de varicosidades en forma de racimo en sus axones, que presumiblemente son terminales axónicas que están en íntimo contacto con segmentos iniciales, incluyendo espinas axónicas, de neuronas piramidales amigdalinas. Al igual que sus semejantes corticales, son inhibitorias (Peters, 1984), estas células probablemente influyen la capacidad de la amígdala para activar otras regiones cerebrales y modular simultáneamente la actividad de neuronas piramidales vecinas.

Otro tipo celular, observado en amígdala basolateral de gato (Kamas y Tömböl, 1975), rata (McDonald,1982b), opossum (McDonald y Culberson, 1981) y mono

(McDonald, 1992), es un tipo de célula pequeña y esférica, con dendritas primarias ramificadas difusamente para formar un campo dendrítico esférico de aproximadamente 100 μm de diámetro. Sus axones también están ramificados y forman una densa red de colaterales en contacto con la vecindad pero nunca con sus propias dendritas. Estas células podrían ser neuronas que formarían parte de circuitos locales.

Estudios de electrofisiología (Chapman y cols., 1990; Rainnie y cols., 1993; Wasburn y Moisés, 1992; y Yajeya y cols., 1997) han permitido caracterizar desde el punto de vista electrofisiológico tres tipos celulares que se corresponden con la clasificación desde el punto de vista morfológica realizada por McDonald (1982). Estos autores establecieron una correlación entre tres tipos morfológicamente descritos y las características electrofisiológicas de cada una de ellas. Así, las células piramidales responderían a su nivel umbral de despolarización con dos potenciales de acción (serían las células tipo *burst*); las células bipolares, a su vez responderían a niveles de despolarización umbral con una serie de potenciales de acción. (serían las células tipo *multiple spike*) y finalmente las células en Granos responderían con un solo potencial de acción (tipo *single spike*).

1.2.1.- Conexiones del Complejo Basolateral Amigdalino

Las conexiones recíprocas del complejo basolateral amigdalino con la corteza, sus proyecciones eferentes al estriado y la semejanza de sus células a las corticales parecen distinguir el complejo basolateral del resto de la amígdala. Todos los núcleos que constituyen el complejo basolateral amigdalino reciben aferencias de la corteza prefrontal, insular, temporal y regiones hipocámpicas y a su vez envían proyecciones a la corteza

entorrinal, insular agranular y orbito-frontal entre otras áreas. En concreto, la porción ventral del núcleo basolateral proyecta a la corteza piriforme mientras que el resto de los núcleos de este complejo lo hacen hacia la corteza agranular y prelímbica. Es necesario mencionar que los núcleos del complejo amigdalino también proyectan al estriado ventral, especialmente al núcleo acumbens y el tubérculo olfatorio. (Newman y Winans *¿??*, 1980; Hemphal y cols., 1981; Fernando y cols., 2002), y al estriado dorsal (Russchen y cols., 1985; Ragsdala y Graybiel, 1988). La proyección amigdaloesstriatal que se origina predominantemente desde los núcleos basal y basal accesorio es considerada una de las aferencias más importantes desde la amígdala. Se piensa que estas proyecciones podrían ser trascendentales para el aprendizaje instrumental, y los efectos estarían mediados a través de eventos emocionales (Killcross y cols., 1997). En menor proporción, neuronas del pálido dorsal y ventral envían información desde el estriado hacia el complejo basolateral (Carlsen y cols., 1985; Groenwegen y cols., 1984). Existen también proyecciones amigdalinas al pálido ventral, aunque menos intensas en comparación con proyecciones hacia áreas ventrales del estriado (Russchen y cols., 1985; Fernando, 2002). El núcleo acumbens (lugar de proyección amigdalina) tiene abundantes proyecciones al pálido ventral. Puesto que, el pálido ventral proyecta al núcleo dorsomedial talámico, el sistema estriado-palidal proporciona otra vía, además de la proyección amigdalina directa al núcleo dorsomedial, a través de la cual la estructura amigdalina podría interactuar con el núcleo talámico y por tanto con la corteza prefrontal. (Amaral y cols., 1992).

También las neuronas localizadas en el extremo horizontal de la banda diagonal de Broca y de la sustancia innominada sublenticular proyectan al grupo basolateral, llevando terminales colinérgicas y no colinérgicas (Carlsen y cols., 1995).

Con respecto al prosencefalo basal, la proyección amigdalina procedente de la división magnocelular del núcleo basal accesorio y la porción parvocelular del núcleo

basal, se extiende hacia el núcleo basal de Meynert y el núcleo de la rama horizontal de la banda diagonal. En cambio, la amígdala recibe importantes aferencias desde la parte anterolateral del núcleo basal de Meynert. Aferencias que terminan fundamentalmente en la porción magnocelular del núcleo basal amigdalino y con menor intensidad en la división magnocelular y ventromedial de núcleo basal accesorio.

La división magnocelular del núcleo basal amigdalino recibe probablemente la proyección más abundante desde la región prosencefálica, a juzgar por la concentración que posee de la enzima colina acetil transferasa (Amaral y cols., 1992). Los núcleos lateral y basolateral reciben la mayor parte de las aferencias del núcleo hipotalámico medial, mientras que el núcleo basal y basal accesorio reciben solo algunas terminales del mismo.

En relación con el tálamo, el núcleo dorsomedial talámico recibe aferencias amigdalinas principalmente desde los núcleos lateral, basal y basal accesorio. Es de destacar un aspecto inusual en la neuroanatomía amigdalina, y es el hecho de que en primates esta proyección no es recíproca. Sin embargo, otros núcleos talámicos si lo hacen, sobre todo los núcleos del tálamo posterior (con aferencias auditivas del colículo inferior) que proyectan hacia los núcleos lateral, basal accesorio, medial y central. Estas proyecciones han sido implicadas posiblemente en respuestas emocionales condicionadas a estímulos auditivos. (Amaral y cols., 1992).

Dentro de la amígdala el complejo basolateral recibe proyecciones procedentes fundamentalmente del núcleo lateral, mientras que las aferencias del resto de los núcleos son escasas. El complejo basolateral corresponde parcialmente a sus proyecciones aferentes, mediante escasas proyecciones al núcleo lateral, el cual recibe a su vez, también muy pocas aferencias desde el núcleo basal, basal accesorio y central.

Las proyecciones que el complejo basolateral amigdalino tiene con casi toda la corteza, son recíprocas por lo que recibe todo tipo de modalidades sensoriales de forma directa o indirecta. Esta coincidencia de información polimodal en algunos de sus núcleos hacen que este complejo sea considerado muy importante en la función de asociación estímulo-refuerzo (McDonald, 1998).

Las terminales estriatales desde el complejo basolateral amigdalino tienden a ser más densas en el estriado ventral y menos densos en la parte dorsomedial del mismo evitando por completo el sector dorsolateral. Esta distribución topográfica es consistente con la idea de que el complejo BL proyecta más densamente hacia la zona del estriado, que, a su vez, recibe entradas de áreas de la corteza recíprocamente conectadas con los núcleos del grupo basolateral. Este esquema de proyección es característico en ratas. (Donogue y Herkenham, 1985).

En general, las proyecciones corticales son glutamatérgicas, en contraste con la naturaleza GABAérgica de las proyecciones procedentes de centros estriatales y palidales. El núcleo accesorio basal es, junto al área amigdalino-hipocámpica, fuente de proyecciones glutamatérgicas hacia el hipotálamo ventromedial vía estría terminalis (Fernando y cols., 2002; Cantera y cols., 1992).

Las conexiones intrínsecas del complejo basolateral amigdalino, fundamentalmente las conexiones desde el núcleo lateral al basal accesorio, y su proyección a la amígdala central parecen constituir la circuitería básica. Dicho de otra forma esta circuitería sería el sustrato neuronal de las emociones y parece estar implicada no solo en los mecanismos de la evaluación de la emoción, sino también directamente en funciones relacionadas con la expresión de la emoción (Le Doux, 1987). Se ha sugerido un papel fundamental también

en procesos que (encode) codifican la motivación, el aprendizaje y la memoria. (Aggleton, 1992).

1.2.2.- Implicaciones Funcionales del Complejo Basolateral Amigdalino

En experimentos realizados en ratas, Whitelaw y cols (1996), demostraron la importancia del núcleo basolateral amigdalino en procesos en los que la utilización de un estímulo neutro previo mejora la relevancia motivacional.

Estudios realizados en monos (Shangera, 1979) han sugerido que la actividad neuronal de las células amigdalinas depende parcialmente del significado emocional que el estímulo tiene para el animal. Estudios posteriores realizados en ratas por Riobos y cols, (1992), han sugerido que los cambios en la descarga neuronal obtenidos en el n. basolateral amigdalino después de un condicionamiento del tipo evitación pasiva están asociados fundamentalmente a las características emocionales del estímulo utilizado. Esto es de vital importancia ya que para que la memorización tenga lugar, si falta el componente de recompensa o castigo, la retención no se hace de forma eficiente.

En humanos, se han asociado las lesiones del complejo amigdalino con déficits en la interpretación de los componentes emocionales del lenguaje, con una reducción de la frecuencia e intensidad de las expresiones faciales, y un trastorno en la interpretación del significado del humor, expresiones faciales y situaciones emocionales (Beeckmans, 1996).

La incuestionable importancia de la amígdala y en concreto del complejo basolateral es mediada a través de sus relaciones con otras estructuras del sistema nervioso,

algunas de las cuales están incluidas dentro del sistema colinérgico. Existen numerosos datos que demuestran que el sistema colinérgico está implicado al igual que el complejo amigdalino en procesos de arousal, atención, aprendizaje y memoria. (Levin, 1992; Aggleton, 1992). La acetilcolina es un neurotransmisor que se encuentra en los mamíferos repartido por todo el sistema nervioso central. Estudios cuantitativos de colina-acetiltransferasa, revelan que el complejo basolateral amigdalino es el destino más importante de las aferencias colinérgicas a la amígdala. Estudios realizados con catechol-acetiltransferasa indican que las aferencias colinérgicas a la amígdala proceden de la sustancia innominata (Carlsen, 1985; Wolf, 1982), si bien la función de estas conexiones no está todavía perfectamente clarificada.

El núcleo basal magnocelular de Meynert, también envía abundantes proyecciones colinérgicas al núcleo BLA. De hecho el núcleo basolateral amigdalino es el destino fundamental de las fibras colinérgicas del núcleo basal magnocelular de Meynert. Este Núcleo magnocelular está íntimamente relacionado con el aprendizaje de la conducta de evitación pasiva; de hecho, la lesión de este núcleo produce déficits en el aprendizaje y con frecuencia ha sido asociado con trastornos patológicos como la enfermedad de Alzheimer. Hay que recordar que la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por marcados déficits en funciones de tipo cognitivo como memoria, lenguaje, capacidad sensorio-motora y perceptual. Dichos trastornos son posiblemente el resultado de la destrucción celular que afecta a corteza, hipocampo, amígdala, n. basal de Meynert, etc. todas ellas estructuras íntimamente relacionadas e involucradas en los procesos de memoria.

Diversos autores han intentado caracterizar los efectos de la acetilcolina sobre el complejo basolateral con el fin de clarificar las funciones de este núcleo. En este sentido, se ha observado que el agonista colinérgico carbacol, provoca una respuesta de despolarización mediada a través de receptores muscarínicos en el complejo basolateral

(Yajeya y cols, 1999) al igual que en numerosas estructuras del sistema nervioso (Colino y cols, 1993; Halliwell, 1989; McCormick, y Prince, 1986, 1987; Muller y cols., 1988; Pelan y Galagher 1992; Segal, 1982; Womble y Moisés, 1992). En las neuronas piramidales amigdalinas esta respuesta postsináptica al agonista muscarínico carbacol es fundamentalmente una despolarización y parece estar generada por cambios en las conductancias tanto del potasio como de cationes no selectivos (Yajeya y cols., 1999; Washburna y Moisés, 1992).

Además de estos efectos postsinápticos, se ha observado que los agonistas muscarínicos reducen la respuesta evocada sinápticamente mediante un mecanismo presináptico. Este efecto, ha sido descrito previamente en hipocampo (Dutar y Nicoll, 1988); Sheridan y Sutor, 1990), en corteza (Hasselmo y Bower, 1992; Kimura y Baughman, 1997), en estriado (Hsu y cols., 1995), en septum (Hasuo y cols, 1988), y en la base del encéfalo (Szerb y cols., 1994), y fue recientemente descrito en amígdala por Yajeya y cols, (2000). Estas acciones han sido atribuidas a distintos subtipos de receptores muscarínicos (M1-M5) (Bagetta y Constanti, 1990; Hsu y cols., 1995; Kimura y Baughman, 1997; Sheridan y Sutor, 1990; Sugita y cols., 1991). Yajeya y cols, (2000) demuestran que en la amígdala, los agonistas muscarínicos bloquean la respuesta excitatoria sináptica mediada por el ácido glutámico, actuando sobre varios subtipos de receptores muscarínicos. Esta capacidad puede jugar un importante papel en la modulación del estado general del sistema nervioso (ciclo sueño/vigilia) y tal vez subyace en muchas funciones amigdalinas.

Watanabe y cols. (1995) han sugerido, por su parte, que los receptores muscarínicos están implicados en la potenciación a largo plazo que tiene lugar en la amígdala. McGaugh y cols. (1992), Ohno y cols. (1992) y Introini-Collison y cols. (1996) propusieron que el

sistema colinérgico tenía en la amígdala un importante papel en determinados procesos de aprendizaje y memoria.

El núcleo basolateral amigdalino contiene además moderadas concentraciones de ácido gamma amino butírico (GABA) (Ben Ari y cols., 1976) e inmunoreactividad GABA (Ottersen y cols., 1976).

Estudios electrofisiológicos muestran que la estimulación eléctrica de aferencias amigdalinas generan en el complejo basolateral respuestas excitatorias seguidas de inhibitorias una de corta latencia (GABA_A) y otra de más larga evolución (GABA_B) (Le Gal La Salle, 1976; Prelevic y cols., 1976, Rainnie y cols., 1991b), mientras que en otros trabajos, la respuesta fundamental fue solo de inhibición (Ben Ari y cols. 1974). La activación de otras estructuras amigdalinas también causa inhibición, todo ello sugiere la presencia de una rica red inhibitoria intra-amigdalina (Le Gal La Salle, 1976). Además, en el caso de las respuestas excitatorias, éstas quedan reducidas o enmascaradas en parte por una respuesta inhibitoria de corta latencia (Le Gal La Salle, 1976), lo que sugiere que la inhibición puede ser debida a la existencia recurrentes colaterales (Le Gal La Salle y Ben Ari, 1981).

La aplicación microiontoforética de GABA en la amígdala suprime la descarga espontánea inducida por Gutamato. (Ben Ari y Kelly 1976), así como la respuesta postsináptica inhibitoria de larga evolución (IPSPs) que es registrada en respuesta a la estimulación de la Estría Terminal y del núcleo lateral de la amígdala en vivo (Molina y cols, 1981) e in vitro (Takagi y Yamamoto, 1981). Este componente inhibitorio es sensible a la Bicuculina.

Gean y cols. (1989) observaron en estudios realizados en un modelo de epilepsia, que los IPSPs GABAérgicos estaban ausentes en la amígdala contralateral, sugiriendo una implicación de la función GABAérgica amigdalina en los procesos epilépticos.

Como la transmisión sináptica en el BLA posee componentes inhibitorios uno rápido mediado a través de GABA_A y otro lento mediado a través de GABA_B, cualquier reducción en la expresión de uno o de ambos potenciales puede mover al núcleo basolateral amigdalino hacia un estado que puede favorecer la génesis de crisis epilépticas. En conclusión, la complejidad de la circuitería sináptica inhibitoria dentro del BLA sugiere que la modulación de esta inhibición puede jugar un papel importante en las posibles (potenciales) propiedades integrativas de estos núcleos. Todos estos datos sugieren que GABA es el mayor neurotransmisor inhibitorio en el núcleo BLA.

2.- PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

2.1.- PLANTEAMIENTO.

En el Sistema Nervioso Central (SNC) y periférico (SNP) se considera fundamental un adecuado equilibrio entre la actividad sináptica excitatoria y la inhibitoria para la regulación de la excitabilidad neuronal y plasticidad sináptica. Debido a que el control de la excitabilidad neuronal en el SNC es altamente dependiente del nivel de inhibición establecido por la actividad de interneuronas GABAérgicas, el estudio de los fenómenos que se encuentran regulando la actividad sináptica en este tipo de neuronas resulta fundamental para comprender el funcionamiento de circuitos neuronales en condiciones normales y patológicas.

Numerosos estudios han llevado a la conclusión de que la amígdala es uno de los componentes fundamentales implicados en el sustrato de la emoción, de la motivación, del aprendizaje y de la memoria, así como de la atención, del estrés y del miedo (LeDoux, 1987; 1992; Aggleton, 1992; Aroniadou-Anderjaska y cols., 2006). Existen también importantes trabajos que implican al sistema colinérgico en procesos de aprendizaje y memoria, estados emocionales y en procesos relacionados con el control de la atención a estímulos periféricos (Levin, 1992).

Por otro lado, estudios realizados en neuronas amigdalinas demuestran la influencia colinérgica sobre las mismas, tanto a nivel postsináptico como presináptico (Washburn y Moises, 1992; Yajeya y cols., 1999; Yajeya y cols. 2000).

Sin embargo, a pesar de estos estudios, las interacciones entre los núcleos amigdalinos y el sistema colinérgico que subyace a las funciones anteriormente expuestas siguen sin esclarecerse totalmente. Así, se ha demostrado que el agonista

muscarínico carbacol modula la transmisión inhibitoria gabaérgica en diversas regiones del sistema nervioso central, sin embargo se desconoce su función en la amígdala. Más concretamente, son escasos los estudios relacionados con el control presináptico muscarínico en la amígdala y la transmisión sináptica inhibitoria en el núcleo basolateral amigdalino de la rata.

2.2.- OBJETIVOS.

Dada la importancia de este sistema de control en la neurotransmisión y teniendo en cuenta la abundante información existente en que se sugiere una estrecha relación entre el sistema colinérgico y la amígdala, nuestro objetivo ha sido estudiar el efecto del agonista colinérgico carbacol sobre la transmisión inhibitoria en las neuronas del complejo basolateral amigdalino, utilizando la técnica de registro intracelular en rodajas.

Más en concreto nuestro objetivo va dirigido a estudiar:

- 1) El control presináptico muscarínico en las neuronas del BLA.
- 2) Los neurotransmisores que median la respuesta postsináptica en las neuronas del BLA.
- 3) El efecto de la activación del receptor muscarínico presináptico sobre la transmisión inhibitoria evocada.

- 4) El/los subtipos de receptores muscarínicos (M1-M5) que medien éste efecto.

Los resultados obtenidos en este estudio podrían ser relevantes para entender los procesos de plasticidad neuronal en esta estructura que ha sido implicada junto con el sistema colinérgico, en la expresión de respuestas de miedo (Van Der Zee et al., 1997), o explicar procesos como los sugeridos por Watanabe y cols. (1995), que implican a los receptores muscarínicos en los fenómenos de potenciación a largo plazo que tiene lugar en la amígdala

Con nuestro diseño experimental proyectamos estimular fibras en el núcleo lateral amigdalino y en la cápsula externa que transmiten al complejo basolateral información procedente de estructuras distintas y, por lo tanto, pueden expresar diferentes subtipos de receptores muscarínicos.

Así mismo, teniendo en cuenta el origen polimodal de las fibras aferentes, el estudio del efecto del carbacol sobre la transmisión inhibitoria, puede aportar datos que pueden ayudar a aclarar el papel de la acetilcolina en la modulación del estado general del sistema nervioso y explicar numerosas funciones amigdalinas en especial de modulación de funciones de otras estructuras con las que se relaciona como es el hipotálamo.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado ratas Wistar con pesos comprendidos entre 80-100 gr. Los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices españolas (BOE 67/8509-12, 1988) y la regulación de la Unión Europea (86/609/UE) para el uso de animales de laboratorio.

Los animales fueron decapitados, bajo anestesia, y tras ser extraído rápidamente el cerebro se le sumergió en una solución Ringer a 4° C con la siguiente composición en mM: 117 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄ y 11 de glucosa. Posteriormente se procedió a tallar la pieza de la que se extrajeron las rodajas. Tras el tallado del área amigdalina, se obtuvieron secciones de 400 μm de espesor mediante un vibratomo (Technical Products International, Inc.) (figura 2). Las secciones se mantuvieron entre 2 y 6 horas en una cámara de incubación en solución de líquido cefalorraquídeo tamponada a pH 7.4, saturada de oxígeno y a una temperatura ambiente.



Figura 2.- Vibratomo empleado para obtener las rodajas amigdalinas.

Para realizar el registro electrofisiológico, se coloca la rodaja correspondiente donde se encuentra la estructura a estudiar en una cámara de perfusión colocada bajo un microscopio y bañada la sección continuamente con el líquido de perfusión. La

aplicación de las correspondientes drogas utilizadas durante el experimento se llevo a cabo disolviéndolas en el medio de perfusión.

3.1. Método de incubación:

Para la incubación de las rodajas se empleó el sistema de interfase Ringer/aire propuesto por Nicoll y Alger (1981) (Figura 3). En nuestro caso, el sistema consistió en una cámara de plástico de 30 cm de longitud, 10 cm de altura y 15 cm de ancho, en cuyo interior se colocaron tres soportes de metacrilato de unos 30 cm de largo, 5 cm de altura y 1 cm de ancho, separados por una distancia de 3 cm. Sobre estos soportes se apoyó una malla de metacrilato de 30 cm de largo, 0,5 cm de altura y 14 cm de ancho. En uno de los extremos de la parte inferior de la cámara, se colocó además, un difusor de gas por el que se burbujeó continuamente carbógeno. La cámara se llenó con agua destilada hasta una altura de 4 cm, de modo que el difusor quedase cubierto por el agua, y que se localizó a 1,5 cm aproximadamente de los cortes. Las rodajas se colocaron sobre pequeñas placas de Petri, dispuestas sobre la malla de metacrilato, que contenían solución de Krebs y estaban cubiertas por un papel de filtro en contacto con la solución. La cámara estaba cerrada con un tapa con un pequeño orificio en el extremo opuesto al difusor de gas. Esto garantizaba una atmósfera saturada de oxígeno y de vapor de agua dentro de la cámara. Las rodajas se incubaron durante un tiempo que nunca fue inferior a dos horas y a temperatura ambiente.

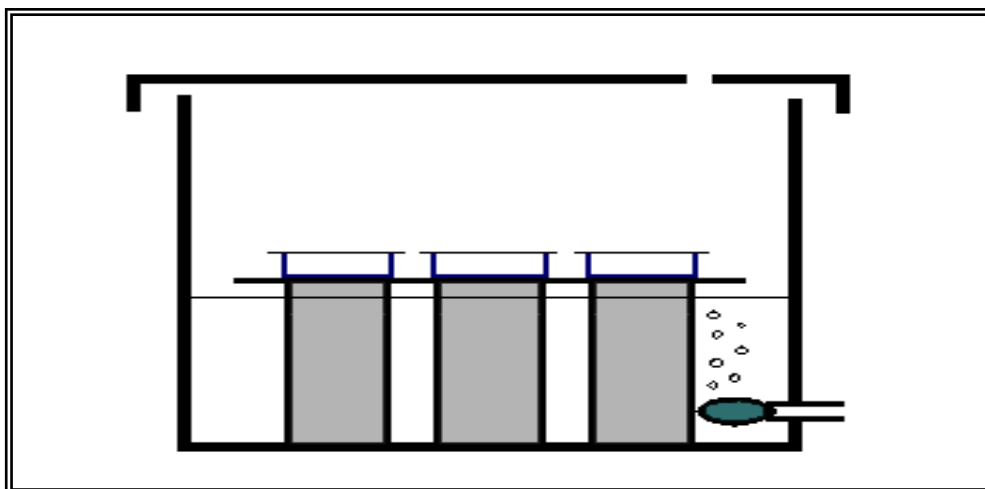


Figura 3. Cámara de incubación. Esquema que representa la cámara de incubación para las rodajas, según Nicoll y Alger (1981). Las rodajas se colocaron sobre una placa de Petri que estaba rellena de solución de Krebs y cubierta por un papel de filtro humedecido. El agua destilada se mantuvo oxigenando con gas carbónico.

3.2. Cámara de registro

Tras un período de incubación, cada rodaja se colocó en una cámara de registro modelo BSC-HT del tipo interfase de gas (Harvard Apparatus Inc.), la cual proporcionaba un intercambio rápido de fluidos y garantizaba estabilidad suficiente para realizar el registro intracelular (Figura 4). En esta cámara, los cortes descansaban sobre una malla elástica de nylon, alrededor de la cual fluye por acción capilar una delgada capa de solución Krebs. Mediante el flujo de carbónico, las rodajas se oxigenaron y humidificaron a lo largo de la superficie superior de la rodaja. La temperatura de la solución se mantuvo entre 30 y 34° C, mediante un termorregulador CTE-1 de Cibertec, el cual posee un sensor de temperatura dentro de la cámara de registro que monitoriza continuamente la temperatura de la solución de Krebs que baña a la rodaja que se está registrando.

La cámara de registro se acopló a una base modelo BSC-BU (Harvard Apparatus Inc.), compuesta de un cilindro de metacrilato de doble pared que encierra un alambre de níquel-cromo, susceptible de ser calentado por el termorregulador, así como tubos de vinilo que llevan la solución hasta la rodaja (Figura 4). Este diseño permitió que el espacio entre las dos paredes de la base pudiese rellenarse con agua destilada, para humedecer al carbógeno que fluye sobre los cortes.

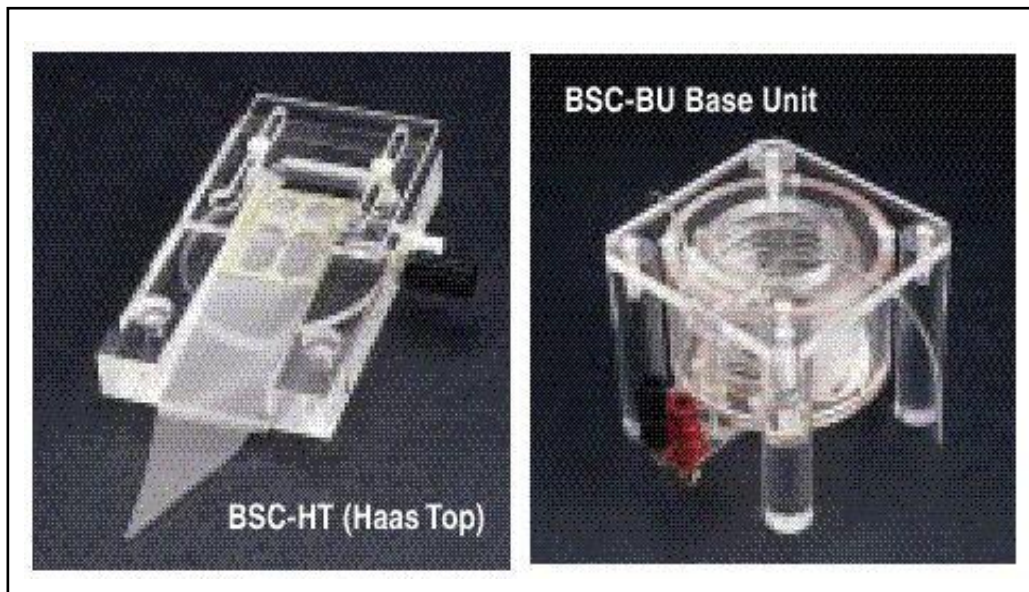


Figura 4- Cámara de registro. Las imágenes corresponden a las unidades BSC-HT y la BSC-BU empleadas para el registro de la actividad neuronal. Ver explicación en el texto.

3.3. Soluciones empleadas

Para la realización de los experimentos se emplearon dos tipos de soluciones de Krebs. Desde la decapitación del animal hasta la obtención de las rodajas se utilizó una solución de Krebs modificada (Tabla 1). Para la incubación y durante todo el proceso de registro se utilizó solución de Krebs normal.

En todo momento, las soluciones se burbujearon con gas carbógeno, para mantener adecuados el aporte de oxígeno y el pH de las mismas.

	Krebs Normal (mM)	Krebs Modificado (mM)
NaCl	117,00	
KCl	4,70	4,70
CaCl ₂	2,50	2,50
MgCl ₂	1,20	1,20
NaH ₂ PO ₄	1,25	1,25
Glucosa	11,00	11,00
NaHCO ₃	25,00	25,00
Sacarosa		234,00

Tabla 1.- Composición de las soluciones de Krebs empleadas.

La disminución de la concentración Na⁺ extracelular en el Krebs modificado, tenía como finalidad minimizar la entrada de Na⁺ al interior celular y, por tanto la despolarización de las neuronas, sobre todo durante la obtención de los cortes. La sustitución de sacarosa por el NaCl a una concentración de 234 mM tuvo como objetivo conservar la osmolaridad total de la solución.

La solución de Ringer normal se introdujo en la cámara de registro mediante una bomba de perfusión 2115 Multiperpex Pump de LKB Bromma. El flujo se ajustó a razón de 2 ml por minuto.

3.4. Electrodo de registro

Los registros intracelulares se obtuvieron en el complejo basolateral amigdalino utilizando microelectrodos de vidrio fabricados a partir de tubos de borosilicato de 1 mm de diámetro externo (A.M. Systems Inc) estirados con un estirador horizontal (Sutter Instruments Co.) (Fig. 5) y con una resistencia de 140-180 MW. Los electrodos se llenaron con una solución de acetato potásico (3M) y se conectaron mediante un hilo de plata clorurada a un acoplador de impedancias (“*headstage*”) de Bio Logic, modelo HS180, con una resistencia de entrada mayor de $1 \times 10^{11} \Omega$ y una capacidad máxima de inyección de corriente de 100 nA. La señal se amplificó (x10) con un amplificador de registros intracelulares Bio Logic modelo VF180 (Fig. 6). Para la visualización directa de los registros se utilizó un osciloscopio Tektronix modelo 5110.



Fig 5. Estirador de pipetas modelo P87, utilizado para hacer los electrodos de registro.

Para la medición del potencial de membrana y la inyección de corriente a través del electrodo se utilizó la técnica de fijación de corriente (“*Current-clamp*”), utilizándose pulsos hiperpolarizantes y despolarizantes para caracterizar la respuesta neuronal y calcular la resistencia eléctrica de entrada de las células.



Figura 6. Amplificador de registros intracelulares Bio Logic VF180

3.5. Electrodo de estimulación

Para evocar respuestas ortodrómicas en el complejo amigdalino se utilizó un electrodo monopolar de acero inoxidable (*Word Precision Instruments. –WPI-*), cuya punta tenía un diámetro de una μm y con una resistencia efectiva de dos $\text{M}\Omega$. Se ajustó un pulso cuadrado de 200 μs de duración y de 100 a 500 μA de intensidad a nivel subumbral para obtener una respuesta ortodrómica. Los pulsos fueron generados por un estimulador modelo CS220, el cual estaba conectado a una unidad aisladora de pulsos modelo ISU 100, ambos de la marca Cibertec.

3.6. Localización de los electrodos de registro y de estimulación

Los electrodos de registro y de estimulación se situaron (Fig. 7) en el lugar correspondiente de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (1998), con la ayuda de un microscopio Axioskop de Zeiss (Fig. 8). Para la colocación y posterior desplazamiento de los electrodos, se emplearon micromanipuladores manuales de la marca Narishige.

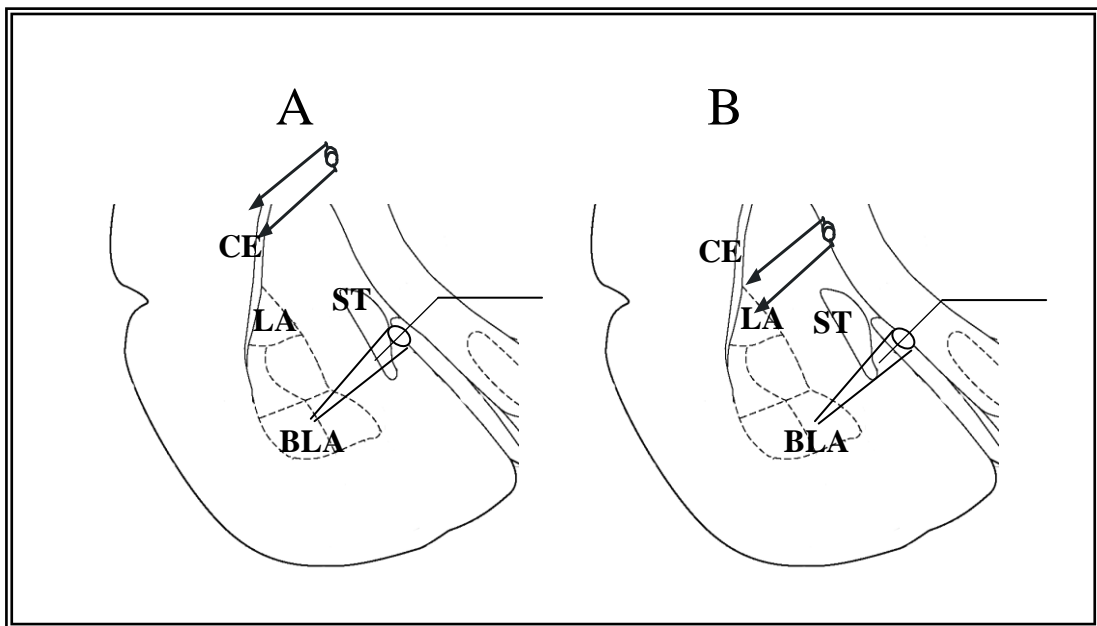


Figura 7. Localización de los electrodos de registro en Núcleo basolateral amigdalino (BLA) y de estimulación en (A) en Cápsula Externa (CE) y en (B) en el Núcleo Lateral Amigdalino (LA). ST: Estría Terminal.

Se realizaron secciones coronales sobre las que se dispusieron los electrodos, el electrodo de registro se situó sobre el complejo basolateral.

Una vez situados los electrodos en el lugar elegido, mediante un micromanipulador se desplazó el electrodo de registro en dirección al tejido. Simultáneamente y a través del mismo electrodo se inyectó un pulso de corriente despolarizante de 0,1 nA de intensidad, 20 ms de duración y una frecuencia de un Hz. Este pulso fue generado por un estimulador modelo 302-T de la marca WPI.



Figura 8. Microscopio Axioskop empleado para la observación de las rodajas y la colocación de los electrodos de registro y de estimulación.

Durante la realización del trayecto, o recorrido del electrodo en el tejido, siempre que se observaba un aumento en la amplitud de la onda registrada por el electrodo, se aplicaba a través del amplificador una oscilación en la punta de la pipeta, lo que facilitaba, de estar cerca de una neurona, la penetración del electrodo en la misma.



Fig. 9- Unidad de registro intracelular

La penetración en el interior de una célula se percibía al observar en el osciloscopio valores de potencial compatibles con valores de potencial de membrana así como por la generación de potencial de acción con el pulso despolarizante. En ese momento y antes de iniciar el experimento, con el fin de que la neurona se estabilizara, se invertía la polaridad del pulso, y se alargaba su duración a 200 ms, disminuyendo además la frecuencia de estimulación a 0,2 Hz.

2.8. Análisis de las respuestas neuronales

En cada neurona registrada se evaluaron las siguientes características electrofisiológicas:

Los potenciales excitatorios e inhibitorios post-sinápticos generados por estimulación en LA y en CE, se caracterizaron de acuerdo a las características siguientes de latencia, amplitud, duración:

- Latencia: Se consideró el tiempo transcurrido desde la aplicación del estímulo subumbral, hasta el inicio del potencial sináptico.
- Amplitud: Se midió como la diferencia de voltaje entre el valor máximo, negativo y el valor del potencial de membrana.
- Duración: Se consideró como duración el tiempo transcurrido desde el inicio hasta el final del potencial sináptico.

En estos casos, sólo se han incluido en el estudio aquellas neuronas que presentaron potenciales de reposo iguales o menores a -55 mV, y sin fijación de voltaje (DC), que generaran potenciales de acción rápidos tras ser estimuladas.

En todos los casos, se intentó obtener un registro inhibitorio postsináptico aislado (simple) para ello intentamos obtenerlo modificando la posición del electrodo de registro, procurando evitar el uso de drogas para bloquear la respuesta excitatoria que podría modificar la respuesta fisiológica. (Rainnie et al., 1991). Se promediaron generalmente 10 potenciales postsinápticos, y en los casos en los que el potencial de membrana cambió durante la aplicación de las drogas correspondientes, se fijó

manualmente el potencial de membrana al valor original de potencial de reposo, antes de iniciar los estudios y registros de las modificaciones correspondientes en los diferentes parámetros a estudiar. Los registros neuronales fueron caracterizados estudiando corrientes de pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes (Yajeya et al., 1997).

2.9. Drogas utilizadas

Todas las drogas utilizadas en este estudio fueron aplicadas disueltas en la solución de Krebs normal e introducidas en la cámara de registro mediante una bomba de perfusión 2115 Multiperplex Pump, LKB Bromma. Éstas fueron: (2R)-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5), atropina, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), bicuculline, carbacol, 4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidine (4-DAMP) y saclofen.

- AP5 (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO): El AP5 es un antagonista potente y selectivo de los receptores NMDA y se utilizó con la finalidad de valorar la participación de los receptores NMDA en la génesis de los potenciales sinápticos excitatorios.
- Atropina (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO): La atropina es un antagonista competitivo inespecífico de receptores muscarínicos. Se utilizó para comprobar la presencia de receptores muscarínicos en las neuronas del complejo basolateral amigdalino.
- 6-Ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO): El CNQX es un potente antagonista competitivo de los receptores

AMPA/Kainato (Watkins y cols, 1990; Lerma, Mora y Prieto, 1998). El CNQX se utilizó con la finalidad de valorar la participación de estos receptores en la génesis de los potenciales sinápticos excitatorios.

- Bicuculina (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO) Bicuculina es un bloqueante específico de los receptores GABA_A. La bicuculina se utilizó con el objeto de comprobar la presencia de receptores GABA_A en la membrana de las neuronas del complejo basolateral amigdalino.
- Carbacol (Research Biochemicals Inc.; Natick, MA.): El carbacol es un agonista no selectivo de los receptores –muscarínicos- colinérgicos. El carbacol se utilizó con el objeto de verificar la presencia de receptores colinérgicos en la membrana de las neuronas del complejo basolateral amigdalino.
- 4-diphenilacetoxy-N-metilpiperidina (4-DAMP) (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO). El 4 DAMP es un antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos con selectividad para los subtipos M₃ y M₅. Se utilizó para testear la posibilidad de que estos dos subtipos de receptores muscarínicos estuviesen implicados en los efectos observados.
- Saclofen (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO) el Saclofen es un bloqueante selectivo de receptores GABA_B y se utilizó con el objetivo de estudiar la presencia de receptores GABA_B en la membrana de las neuronas del complejo basolateral amigdalino.

2.10. Adquisición y almacenamiento de los datos

Los datos obtenidos fueron adquiridos y almacenados como señales analógicas en videocasete usando una vídeo grabadora modificada (Cibertec

Physiorec-3). Las señales registradas se visualizaron a través de un osciloscopio Hameg modelo HM 205-3 (Figura 7), simultáneamente con la grabación, lo que permitió comparar las señales observadas en ambos osciloscopios y verificar que las grabadas no presentaban modificaciones.

Los datos se transfirieron con posterioridad a un ordenador con un procesador Pentium III de 450 MHz, usando la interfase convertidora analógica-digital CED 1401 plus. Para la adquisición de los datos por el ordenador se utilizó el programa Spike 2 Capture, versión 4, de Cambridge Electronic Desing. Se utilizó una velocidad de muestreo de 2.083 Hz para adquirir los datos. Estos datos fueron posteriormente analizados mediante el programa Spike2 Data Análisis, versión 4 de Cambridge Electronic Desig, o transformados en archivos binarios para su análisis mediante el programa Mini Analysis Program versión 5.2.0 de Synaptosoft.

2.11. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statistica para Windows versión 5.0 de StatSoft, Inc. Todos los datos electrofisiológicos se expresaron como media \pm error estándar ($\xi \pm EE$). En todos los casos, n es el número de neuronas. Las diferencias entre las medias se determinaron mediante el test t de Student y, así como en su caso análisis de varianza (ANOVA). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas las encontradas para un nivel de significación de $p < 0,05$.

2.12. Representación gráfica de los datos

Los gráficos presentados en el apartado de resultados, se realizaron mediante el programa *Mini Analysis Program*, versión 5.2.0 de *Synaptosoft* y el *Spike2*, versión 4 de *Cambridge Electronic Desig*, usando los formatos gráficos vectoriales (WMF y HPLG) y representados con el *CorelDraw*, versión 8, de *Corel Corporation*. Estos tipos de formatos gráficos vectoriales tienen la ventaja de permitir gráficos de alta resolución; y, por otra parte, permiten modificar su tamaño sin que se afecte su resolución o se produzcan distorsiones de los mismos. Todos los registros que se presentan, salvo aquellos cuya duración fue mayor de 5 minutos, son el resultado del promediado de 5 a 10 barridos.

3. ESTUDIO MORFOLÓGICO

Los estudios morfológicos realizados se centraron en la caracterización morfológica de las neuronas del complejo *basolateral amigdalino*.

Para estos estudios se han utilizado dos trazadores neuronales: la biocitina (Sigma Chemical Co, EEUU), conjugado natural de biotina y lisina, que es un trazador con transporte predominantemente anterógrado,

3.1. Caracterización neuronal

Para la caracterización morfológica de las neuronas del núcleo del complejo *basolateral amigdalino*, se emplearon microelectrodos que contenían en su interior biocitina al 2% en acetato potásico 2 M.

Aplicación del trazador

Una vez completado el estudio electrofisiológico de la neurona se procedió a la inyección intracelular de biocitina iontoforéticamente, mediante la aplicación de un pulso de corriente de 0,2 nA de intensidad y una frecuencia de 3 Hz, (pulsos de 200ms de duración) durante un periodo entre 2 y 6 minutos. Una vez inyectada la biocitina se extrajo la rodaja de la cámara de registro y se colocó nuevamente en la cámara de incubación durante 30 minutos.

Fijación y crioprotección de las rodajas

A continuación la rodaja se fijó por inmersión en glutaraldehído al 1,25% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,6 durante 35 minutos. Posteriormente, tras dos lavados de 15 minutos con tampón fosfato 0,1 M, la rodaja se introdujo en sacarosa al 30% en tampón fosfato 0,1 M, durante 24 horas para su crioprotección.

Procesamiento de las rodajas

Las rodajas se cortaron con un microtomo de congelación HM 400 R (Microm Heidelberg) (figura 16), obteniéndose secciones seriadas de 45 μ m de grosor, que se recogieron en tampón fosfato 0,1 M. A continuación, se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena mediante la incubación de las secciones en una solución que contenía 8 partes de tampón fosfato 0,1 M, una parte de metanol y una parte de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30%, durante 12 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se hicieron tres lavados con tampón fosfato 0,1 M de 10 minutos cada uno, y 3 lavados más con tampón Tris salino (NaCl 8,5%) 0,05 M con 0,5% de Tritón X-100 a pH 8 (TBS-Tx 0,05 M, pH 8) de 15 minutos cada uno. Finalizado los lavados, las secciones se incubaron con el complejo avidina-

peroxidasa de rábano biotinada (ABC, Laboratorios Vector) durante tres horas a temperatura ambiente.

Detección citoquímica de la biocitina

Tras la incubación de las secciones en el complejo ABC, se hicieron 3 lavados con tampón Tris-HCl 0,05 M, pH 8 de 15 minutos cada uno. Para revelar la biocitina se utilizaron 375 µl de 3-3` diaminobencidina como cromógeno y la reacción se intensificó con 100 mg de sulfato de amonio y níquel. Antes de usar se agregaron 5µl de agua oxigenada al 30%. El proceso de revelado se controló mediante microscopía óptica y una vez completado éste las secciones se lavaron 2 veces, durante 15 minutos cada lavado con Tris-HCl 0,05 M pH 8.

Montaje de las secciones

Las secciones se montaron en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar al aire. Se contrastaron con violeta de cresilo y se cubrieron con Entellan (Merck, Alemania), para su observación al microscopio. La tinción con violeta de cresilo permitió establecer la posición de la neurona marcada con respecto a la citoarquitectura del complejo *basolateral amigdalino*.

Reconstrucción neuronal

Las neuronas fueron reconstruidas a partir de las secciones seriadas. Para ello se hicieron dibujos utilizando una cámara clara, de todos los cortes que contenían, al menos, una parte de la neurona estudiada. Una vez realizados todos los dibujos se superpusieron orientando los papeles hasta obtener una adecuada correspondencia o ajuste de todos los elementos seccionados de la neurona, para finalmente realizar un dibujo completo de la misma.

3.3. Análisis morfológico de los resultados

Las secciones, fueron analizadas minuciosamente con un microscopio Leica DM RB (figura 12), para la caracterización morfológica de las estructuras neuronales marcadas. Los campos microscópicos más representativos fueron fotografiados mediante una cámara digital (Cool Snap) acoplada al microscopio.



Figura 10. Microscopio DM RB utilizado para la reconstrucción neuronal

4.- RESULTADOS

El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar el efecto del agonista colinérgico carbacol sobre la transmisión inhibitoria en las neuronas del complejo basolateral amigdalino. Con este objetivo y siguiendo el protocolo experimental expuesto en el apartado de Métodos hemos obtenido los resultados que se muestran a continuación.

4.1. Caracterización electrofisiológica de las células registradas

Hemos estudiado 104 neuronas en el complejo basolateral amigdalino. El potencial de reposo de las neuronas registradas fue de -67 ± 7 mV; la resistencia de entrada fue de 15.4 ± 6.0 M Ω , y la constante de tiempo fue de 30.5 ± 3.4 milisegundos, siendo el potencial umbral de -56.25 ± 1.2 milivoltios. La mayoría de las neuronas registradas no presentaron potenciales de acción a valores de potencial de membrana en reposo. Las neuronas fueron caracterizadas electrofisiológicamente al comienzo de cada experimento una vez comprobada la estabilidad de la neurona registrada. Se descartaron aquellas que no se mostraban estables en el registro.

La caracterización electrofisiológica se realizó en función del tipo de respuesta a la estimulación mediante la aplicación de un pulso despolarizante de 200ms de duración y de intensidad creciente hasta alcanzar el nivel umbral de despolarización capaz de generar potencial de acción. De esta manera hemos clasificado las neuronas registradas en tres grupos: células tipo I, células tipo II y células tipo III respectivamente, siguiendo la clasificación desde el punto de vista electrofisiológico utilizada por Chapman (1990) y Yajeya y cols. (1999), Ashenafi y cols. 2005.

De todas las neuronas registradas, el grupo más numeroso de células, en concreto 68 neuronas, que suponen el 65% del total, fueron caracterizadas como pertenecientes al grupo II de Chapman (1990) y Yajeya (1999). Su potencial de reposo fue de $-67.12 \pm$

0.43 mV, con resistencia de entrada de $14.15 \pm 2.35 \text{ M}\Omega$. El potencial umbral promediado de estas neuronas fue de $-50.30 \pm 0.73 \text{ mV}$, siendo los valores promediados de amplitud de las espigas de $-70.73 \pm 0.97 \text{ mV}$. Su duración media ha sido de $1.22 \pm 0.06 \text{ ms}$.

Las células de este grupo (Figura 11) también se las ha denominado tipo *burst*, ya que la despolarización de las mismas hasta su nivel umbral generó una respuesta consistente en una serie de dos o tres potenciales de acción (*burst*). Éstos potenciales presentaron, tanto en el segundo como en el tercero, en su caso, una disminución en su amplitud y un aumento de su duración. Además, al aumentar la intensidad del pulso despolarizante, el *burst* se seguía de un tren de espigas, todas de la misma amplitud, aumentando la frecuencia de las espigas a medida que aumentaba la despolarización. El tren de potenciales de acción, presentó una cierta tendencia a la acomodación y una marcada hiperpolarización (tipo II).

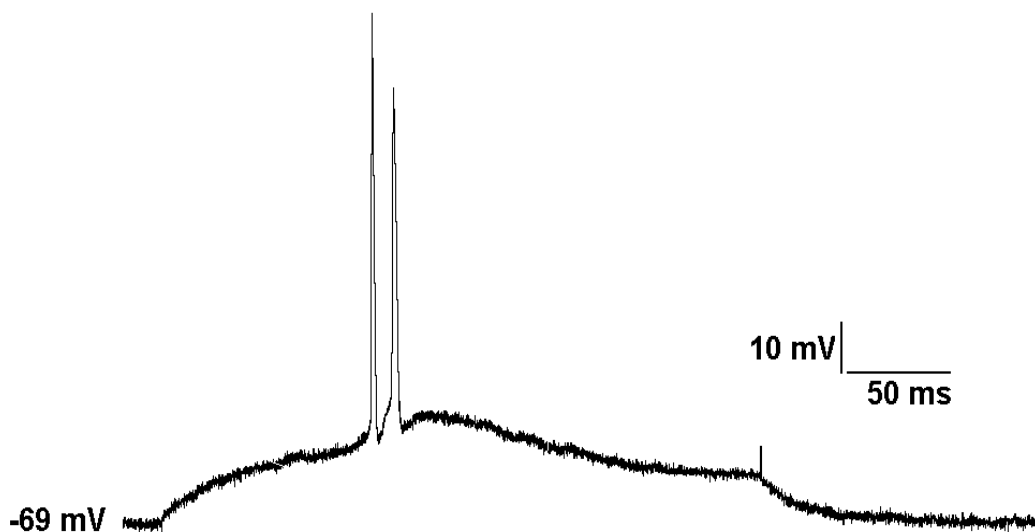


Fig 11.- Muestra el tipo de respuesta de una neurona del núcleo basolateral amigdalino, a la estimulación a nivel umbral en la Cápsula Externa. El tipo de respuesta se corresponde con una neurona tipo "burst".

Un segundo grupo de neuronas las caracterizamos como correspondientes al tipo I de Chapman (1990) y Yajeya (1999) (Figura 12) y está formado por 29 células (28%) que fueron definidas como neuronas tipo *múltiple spike*. Estas neuronas presentaron un potencial de membrana en reposo de -68.15 ± 0.68 mV, una resistencia de entrada de 14.86 ± 1.28 M Ω . El potencial umbral fue de -51 ± 1.00 mV, el potencial de acción tuvo una amplitud de 85.20 ± 4.64 mV en el primer disparo y 64.35 ± 1.90 mV en el segundo. La duración media de los potenciales de acción fue de 1.5 ms en el primero y de 2.5 ms en el segundo caso.

La despolarización de estas neuronas, a nivel umbral, generó una respuesta consiste en un tren de potenciales de acción. Cada uno de estos potenciales de acción se seguía de una marcada hiperpolarización y una lenta despolarización hasta alcanzar el umbral.

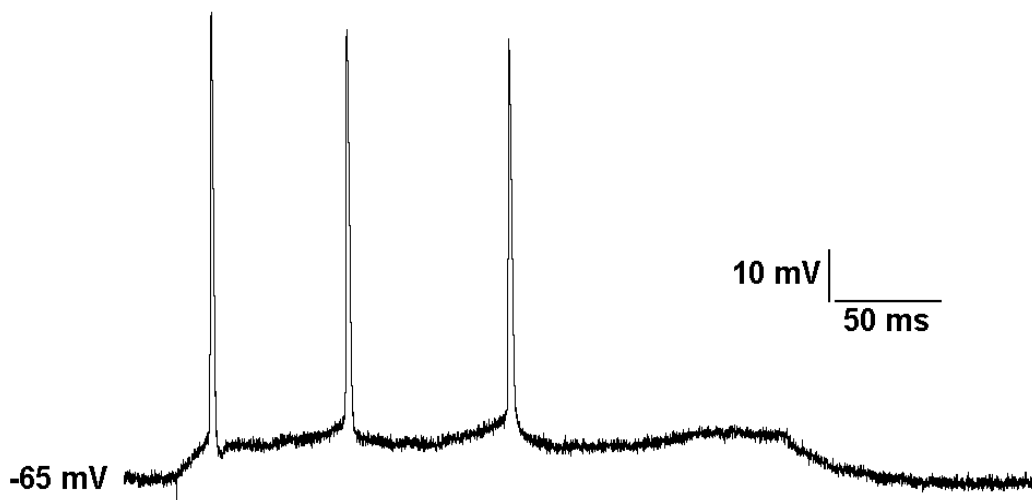


Fig. 12. - Muestra el tipo de respuesta de una neurona del núcleo basolateral amigdalino, a la estimulación a nivel umbral en la Cápsula Externa. El tipo de respuesta se corresponde con una neurona tipo "multiple spike".

Los sucesivos potenciales de acción no disminuyeron en amplitud ni aumentaron en duración tanto como lo hicieron las neuronas del grupo anterior (tipo II). El tren de potenciales de acción presentó habitualmente una rápida acomodación (Figura 12).

Por último, un tercer grupo de neuronas fue definido como grupo III o neuronas de tipo *single Spike* (Figura 13). Este grupo de células es el menos numeroso y está constituido por 7 neuronas (7% del total de neuronas registradas). En este grupo de neuronas el potencial de reposo fue de -68 ± 3.75 mV con una resistencia de entrada de 12.55 ± 2.53 M Ω . Presentaron además un potencial umbral de -50 ± 1.25 mV, y una amplitud promedio de las espigas de -70.20 ± 3.85 mV y duración media de 2.60 ms.

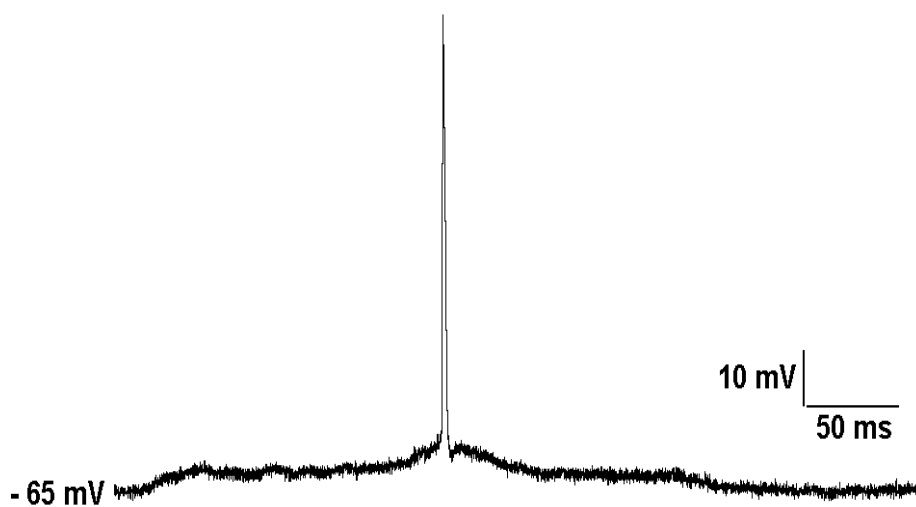


Fig.- 13. Muestra el tipo de respuesta de una neurona del núcleo basolateral amigdalito, a la estimulación a nivel umbral en la Cápsula Externa. El tipo de respuesta se corresponde con una neurona tipo “single spike”.

La despolarización de este tipo de neuronas a su nivel umbral generó un solo potencial de acción con independencia de valor del potencial de membrana, ya que su

despolarización por encima del umbral siguió generando la misma respuesta. Este tipo electrofisiológico de neuronas fueron identificadas como neuronas de espiga única o *single spike* (Figura 13).

4.2.- Caracterización morfológica de las células registradas

Con el objetivo de comprobar una relación entre la respuesta electrofisiológica y las características morfológicas de la neuronas registradas, inyectamos con éxito biocitina en 11 neuronas (5 de tipo *burst* y 6 de tipo *multiple Spike*, y 3 de tipo *Single Spike*).

La reconstrucción morfológica de las células inyectadas con biocitina demostró que cinco de ellas mostraban un soma de forma piramidal o piriforme y presentando una arborización dendrítica densa en ambos lados del soma con orientación opuesta (Figura 14 A). Observándose, además, la ausencia de dendrita principal o apical. Estas características morfológicas apoyan la identificación de estas neuronas como bipolares. Todas las neuronas descritas anteriormente resultaron ser interneuronas de circuito local en su clasificación electrofisiológica (Figura 12).

Seis de las neuronas a las que inyectamos biocitina presentaron características similares al grupo anterior en cuanto a la morfología del soma. Sin embargo presentaban diferencias como una dendrita apical que se iniciaba en uno de los polos del soma celular junto con una densa ramificación de varias dendritas basales que se originan y se orientan hacia el lado opuesto. Éstas, son características morfológicas que definen el este tipo celular como piramidal (Figura 14B). Electrofisiológicamente todas estas células piramidales presentaron respuestas del tipo principal tipo piramidal o *burst* (Figura 11).

Las dos neuronas restantes con características electrofisiológicas del tipo de espiga única morfológicamente eran idénticas al grupo II (Figura 14B).

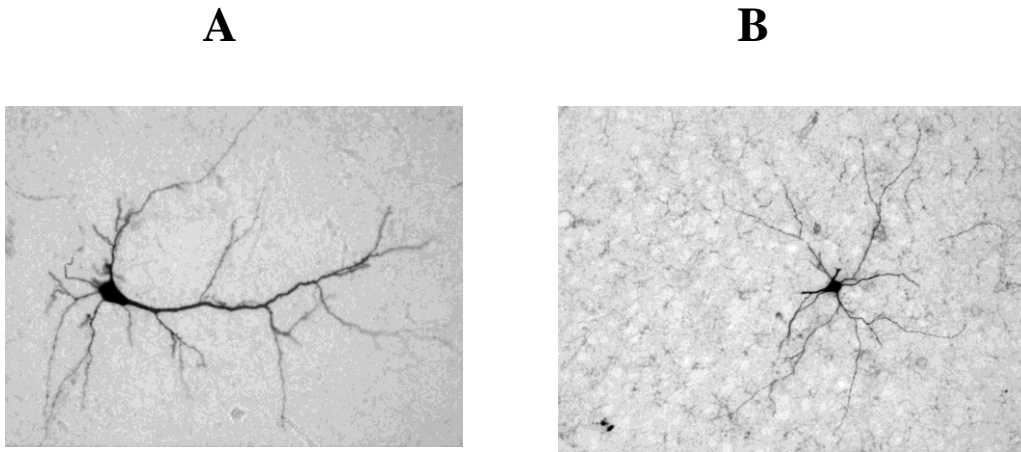


Fig.-14.- A, B, muestran los dos tipos de neuronas: A) Neurona de tipo Piramidal; B) Interneurona de circuito local

4.3.- Respuestas en el complejo basolateral amigdalino a la estimulación en cápsula externa y en el núcleo lateral amigdalino.

Con el fin de investigar la naturaleza sináptica de las señales aferentes a las neuronas del BLA desde la cápsula externa y el núcleo LA, estas dos últimas estructuras fueron estimuladas a nivel subumbral, obteniéndose dos diferentes tipos de respuestas sinápticas.

La estimulación tanto en la cápsula externa (38 casos) como en el núcleo lateral amigdalino (66 casos) generó en las neuronas amigdalinas dos tipos de respuestas sinápticas:

La respuesta denominada ya como “clásica” y de más frecuente aparición está formada por dos componentes uno excitatorio (EPSP rápido), que aparece a una latencia corta y finaliza de forma brusca (Figura 14A), y va seguido de un segundo componente de carácter inhibitorio, (IPSP) constituido éste a su vez por dos componentes, uno rápido (IPSP rápido) seguido de uno de evolución más lenta (IPSP lento) (n= 83) (Figura 14A). Este tipo de respuesta apareció tanto estimulando en CE como en LA.

- También se encontró otro tipo de respuesta (Figura 14B) que consistió en una respuesta postsináptica inhibitoria (IPSP) constituido en la mayoría de los casos por dos componentes uno rápido (IPSP rápido) seguido de uno de evolución más lenta (IPSP lento) (n= 18). Es de destacar que este tipo de respuesta exclusivamente de tipo inhibitorio apareció siempre como consecuencia de la estimulación en LA.

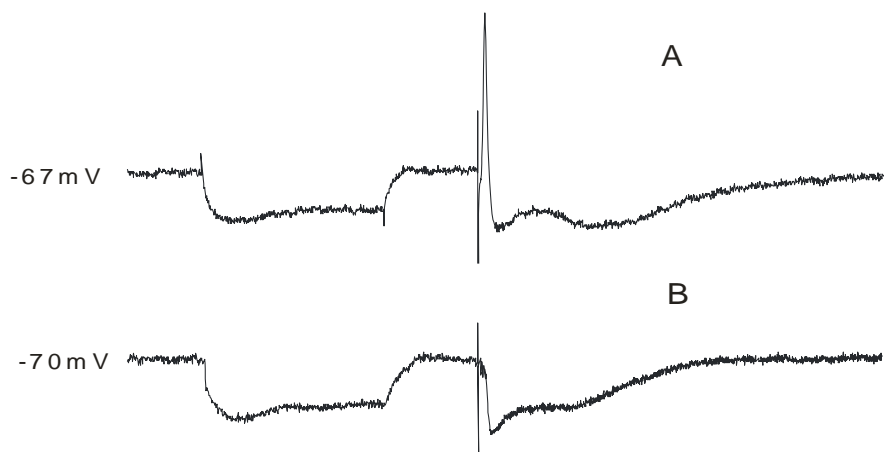


Fig. 14.- Muestra los dos tipos de respuestas encontradas en el complejo basolateral amigdalino, tras la estimulación en cápsula externa y/o en el núcleo lateral amigdalino.

Hemos encontrado también diferencias dependiendo de la localización del electrodo de estímulo ya fuese en CE o en el LA, en relación a la corriente requerida para conseguir la amplitud máxima de la respuesta inhibitoria (IPSP) que difiere significativamente en el caso de CE en la que se necesita una estimulación media de $30 \pm 2.5 \mu\text{A}$ (n= 12), de la que se requiere cuando se estimula en el LA, en este caso de $17 \pm 3.1 \mu\text{A}$ (n= 12; $P = 0.05$).

4.4.- Componente Excitatorio de las Respuestas de las Neuronas del BLA a la Estimulación en EC/LA.

Como la mayoría de las respuestas inhibitorias presentaban una actividad excitatoria previa que enmascaraba en parte la respuesta inhibitoria, el primer objetivo ha sido intentar bloquear esta respuesta excitatoria (EPSP) para así estudiar la respuesta inhibitoria de forma aislada.

Para caracterizar los neurotransmisores implicados en este componente excitatorio de las respuestas sinápticas, se perfundieron las rodajas con diferentes drogas glutamatérgicas. Para ello se perfundió la preparación con 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), a una concentración $10 \mu\text{M}$. El CNQX es un bloqueante específico de los receptores AMPA/kainato, sin embargo aún así, tras aplicar el CNQX permanecía una cierta actividad excitatoria (PEPS), que quedó completamente bloqueada añadiendo 2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5), a una concentración $30 \mu\text{M}$, (n=54) (Figura 15A). El AP5 es un antagonista de los receptores NMDA.

En un número importante de neuronas (n=50) con la perfusión de los antagonistas glutamatérgicos CNQX y AP5, no solo disminuyó significativamente la respuesta

excitatoria, sino que además ambas respuestas inhibitorias, IPSP rápido y IPSP lento, también redujeron su amplitud, incluso llegando a bloquearse por completo ambas respuestas, excitatoria e inhibitorias (Figura 15B).

Una vez aislada la respuesta inhibitoria y con el objetivo de evitar errores a la hora de medir la latencia de la respuesta, hemos tomado como referencia el pico de máxima amplitud en la respuesta inhibitoria en lugar del inicio de la respuesta.

La latencia del IPSP aislado, que se midió desde el momento de estimulación en la CE hasta el punto de máxima hiperpolarización fue relativamente corto (10.57 ± 3.94 ms, $n=12$). El estudio de varianza ($F= 20.19$ (8,27), $P>0.05$). En cuanto a la estimulación en el LA, la latencia observada fue de 10.57 ± 3.94 ms, $n=15$). El estudio de varianza ANOVA reveló también en este caso que el aumento de la intensidad de estimulación en el EC/LA tampoco generó modificaciones estadísticamente significativas en la latencia de la respuesta ($F= 20.19$ (8,27), $P>0.05$).

En relación con la amplitud de la respuesta inhibitoria, el IPSP rápido alcanzó una amplitud máxima de -6.5 ± 1.7 mV en 25.8 ± 2.3 ms ($n=15$). En cuanto a su duración ésta fue de $54,4 \pm 2.1$ ms, manteniendo fijado el potencial de membrana en su nivel de reposo. Mientras que el IPSP lento, se caracterizó por aparecer a una latencia medida al pico de máxima hiperpolarización de 270.3 ± 4.6 ms ($n= 9$), siendo la amplitud del mismo de -5.4 ± 0.2 mV y por una prolongada hiperpolarización mantenida durante 465.3 ± 4.2 ms ($n=9$) mantenido el registro a nivel de su potencial de reposo.

Las amplitudes tanto del IPSP lento como del rápido fueron dependientes de la intensidad de estimulación.

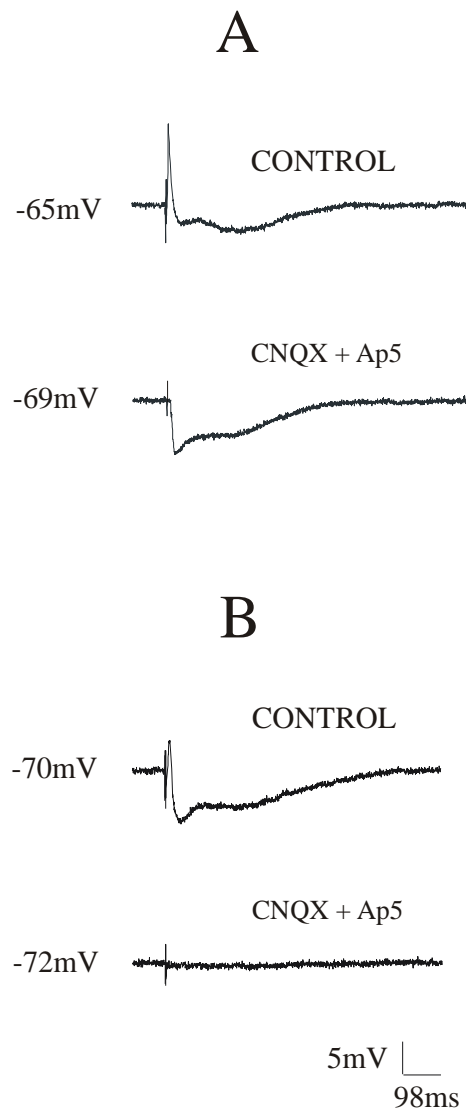


Fig. 15.- Actividad postsináptica evocada en neuronas del complejo basolateral amigdalino por estímulo en la cápsula externa. Efecto de CNQX y AP5, bloqueantes de receptores non-NMDA y NMDA respectivamente, sobre la actividad sináptica evocada.

4.5.- Estudio de la neurotransmisión inhibitoria de las neuronas en BLA implicada en las respuestas evocadas por la estimulación de EC/LA.

Con el fin de valorar el tipo de receptor implicado en esta transmisión inhibitoria, perfundimos la preparación con un bloqueante específico de los receptores GABA_A, Bicuculina y/o un bloqueante específico de receptores GABA_B (Saclofen). Nuestros resultados muestran que el componente inhibitorio más rápido de estos IPSP fue bloqueado perfundiendo el tejido con Bicuculina (30 μ M, n=12) (Figura 16) La reducción en la respuesta inhibitoria temprana generada por la Bicuculina fue independiente de cambios en el potencial de membrana, mientras que la respuesta inhibitoria más tardía, no se redujo con la perfusión de Bicuculina mientras que sí fue antagonizada mediante la perfusión del tejido con el antagonista específico de receptores GABA_B, Saclofen, (50 μ M, n=11), efecto que no afectó al potencial de membrana.

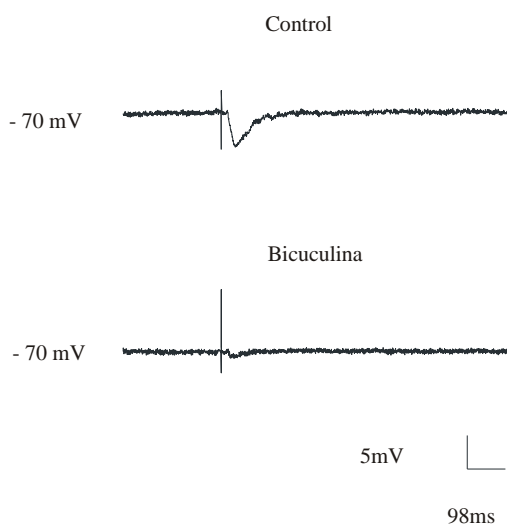


Fig. 16 .- Efecto del bloqueante de receptores GABA tipo A (bicuculina) sobre la actividad inhibitoria evocada. El trazado superior muestra el registro de la actividad inhibitoria (PIPS) evocada por estímulo del núcleo lateral amigdalino. El trazado inferior muestra el efecto del bloqueante de receptores GABA tipo A (bicuculina) sobre la actividad evocada. A la izquierda de cada trazado se muestra el valor del potencial de membrana

4.6.- Actividad inhibitoria espontánea IPSP

Hemos registrado actividad espontánea inhibitoria en 60 neuronas del BLA (Figura 17). La actividad espontánea inhibitoria observada nunca era precedida de actividad excitatoria, como ocurría en las respuestas evocadas previamente mostradas.

Estas respuestas espontáneas obtenidas a nivel de reposo de potencial de membrana estuvieron presentes a frecuencias de $0.28 \pm 0.05 \text{ Hz}$ ($n=12$) y consistieron en dos tipos de actividad espontánea inhibitoria, una de ellas presentaba dos componentes, uno rápido seguido de otro con un curso temporal más lento; En otros casos la actividad inhibitoria espontánea estaba constituida solo por el componente rápido.

El componente rápido de la respuesta espontánea inhibitoria presentaba una amplitud media de $2.9 \pm 0.6 \text{ mV}$ ($n= 15$) registrándola a -60 mV de potencial de membrana. Estos IPSP espontáneos presentaron características similares a los IPSP rápidos evocados por estimulación en CE presentados anteriormente. Esto es, aumentan en amplitud con la despolarización de la membrana desde los valores RMP, presentan un potencial de inversión a valores del potencial de membrana más negativos de -75 mV . Ocasionalmente, se observó un IPSP lento tras un espontáneo IPSP rápido. Este espontáneo IPSP lento también presentó las mismas características similares a los IPSP lentos evocados por estimulación en CE, aumentando su amplitud con la despolarización de la membrana desde valores de RMP, y disminuyendo gradualmente en amplitud con la hiperpolarización de la membrana, alcanzando el potencial de inversión en polaridades cercanas a -90 mV . Cuando las amplitudes del IPSP lento y rápido se representaron en función del potencial de membrana se observó una clara separación entre los potenciales

de inversión. Estos potenciales lentos desaparecieron cuando profundizamos la preparación con bloqueantes glutamatérgicos CNQX (10 μ M y AP5 (30 μ M) (Figura 17).

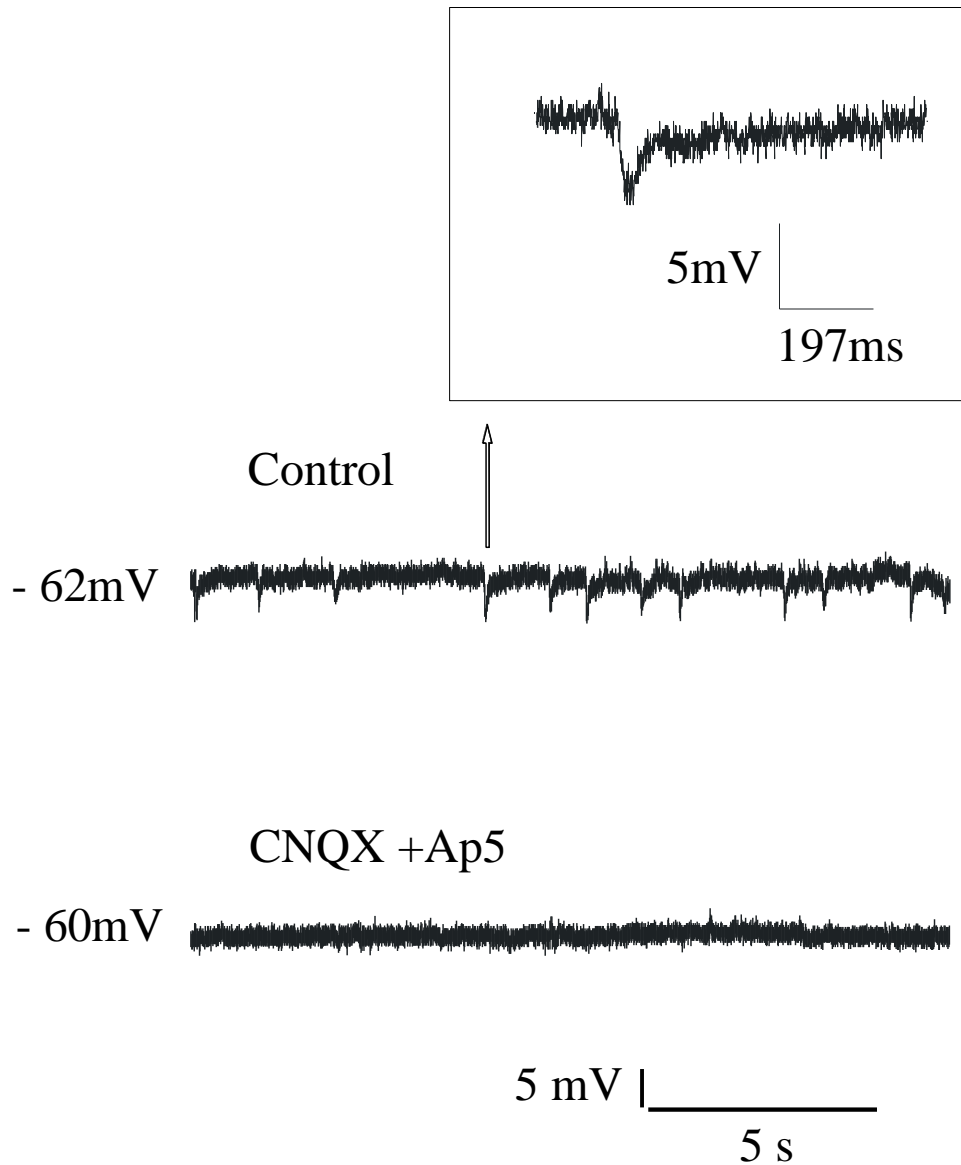


Fig. 17.- Registro de la actividad espontánea en el BLA en situación control y tras la perfusión con CNQX + AP5. Nótese la desaparición de la actividad espontánea. Enmarcado en la parte superior se observa amplificado un IPSP espontáneo.

4.7.- Efectos del carbacol sobre el potencial de membrana.

La aplicación del agonista muscarínico carbacol (10 μ M) generó en la mayoría de las ocasiones en primer lugar una lenta y progresiva despolarización de la membrana (8.4 ± 3 mV, n=20). Esta despolarización que de inicio es lenta se acompañó posteriormente de disparos de potenciales de acción. Estos efectos se acompañaron de una pequeña disminución en la resistencia de la membrana. Esta despolarización de la membrana se bloqueó completamente perfundiendo la rodaja con el antagonista selectivo de receptores muscarínicos atropina (a concentración 1 μ M). Hay que decir aquí también que la perfusión de la rodaja exclusivamente con atropina no originó cambios significativos ni en el potencial de membrana ni en la resistencia de entrada.

4.8.- Efectos del carbacol sobre la respuesta postsináptica inhibitoria

Una vez aislada la respuesta inhibitoria bloqueando la actividad excitatoria que la enmascaraba, con CNQX, y AP5, inyectamos corriente mediante DC para mantener el potencial de membrana fijado a nivel de reposo. En estas condiciones profundimos la preparación con carbacol (10 μ M). Los resultados obtenidos (Figura 18) muestran que la perfusión con carbacol reduce la amplitud de los dos componentes de la respuesta inhibitoria (n=20), incluso en algunos casos (n=8), llega a bloquear completamente la respuesta inhibitoria. Este efecto parece afectar antes al componente lento que al rápido que se anula completamente.

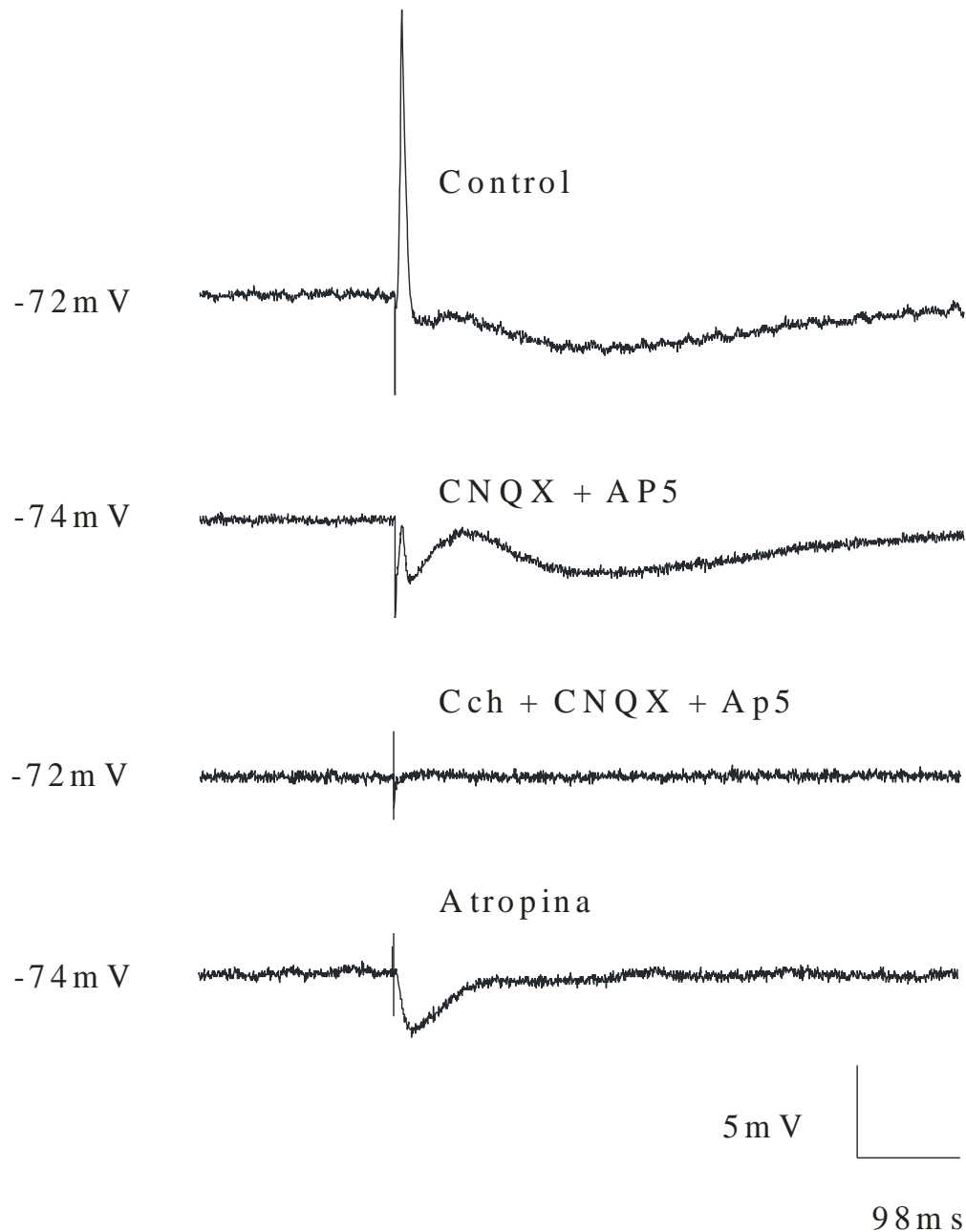


Fig 18.- En el primer trazado se observa el registro de la actividad inhibitoria postsináptica tras la perfusión con CNQX y AP5. En el segunda trazado el efecto del agonista muscarínico Carbacol sobre el potencial inhibitorio postsináptico. Por último se observa en el trazado inferior el efecto de la atropina, bloqueante muscarínico, sobre la respuesta colinérgica. A la izquierda de cada trazado se muestra el valor del potencial de membrana

Estos efectos del Carbacol sobre la respuesta inhibitoria generada tanto por estimulación en CE como en LA, se revirtieron de forma significativa mediante la perfusión con el antagonista muscarínico atropina ($1.5\mu\text{M}$; $n=10$), recuperándose ambos componentes inhibitorios (Figura 18) y bloqueándose el efecto colinérgico.

Así mismo, la perfusión con Carbacol ($10\text{-}20\ \mu\text{M}$), generó un efecto postsináptico en las neuronas amigdalinas que consiste en la mayoría de las ocasiones en una lenta despolarización. Sin embargo, en nuestros experimentos registramos el potencial de membrana y la respuesta evocada EPSP/IPSP durante 8 a 15 min. ($n=8$). Observando que la amplitud del IPSP se redujo antes de que se detectasen modificaciones en la resistencia de la membrana y en el potencial de reposo de la membrana.

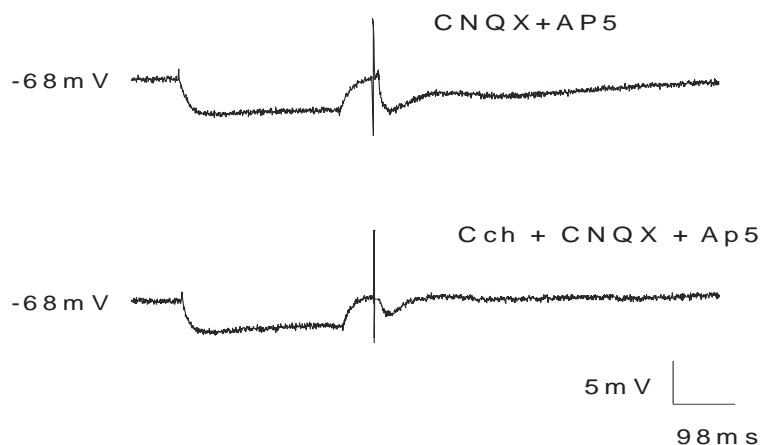


Fig 19.- Efecto depresor del carbacol sobre la respuesta evocada por estimulación en LA. La disminución en la amplitud del PIPS aparece sin que aún se haya modificado el valor del potencial de membrana.

La inhibición de la transmisión sináptica inducida por carbacol se revirtió lavando la preparación con una solución Krebs en la que mantuvimos la concentración de CNQX y de AP5 para mantener bloqueado el efecto glutamatérgico.

Una vez recuperada la respuesta perfundimos la preparación con bloqueantes GABA de tipo A (Bicuculina 30 μ M) y de tipo B (Saclofen 50 μ M). La perfusión con bicuculina bloqueó el componente rápido de la respuesta inhibitoria, mientras que la perfusión con saclofen bloqueó el componente lento de la respuesta inhibitoria (Figuras 20 y 21).

4.9.-Caracterización del subtipo de receptor muscarínico que media la modulación que el carbacol induce en la respuesta inhibitoria.

Tras probar que los efectos del carbacol sobre la respuesta inhibitoria era bloqueada completamente con atropina, lo que sugiere la implicación de receptores colinérgicos de tipo muscarínico, intentamos identificar el subtipo específico de receptor muscarínico responsable de estos resultados.

En este contexto, aislamos en primer lugar la respuesta inhibitoria utilizando antagonistas glutamatérgicos (8.7 \pm 0.6 μ M; n=6) y aplicamos el agonista muscarínico carbacol (10 μ M), evocando con ello una severa reducción de la respuesta inhibitoria (1.9 \pm 0.4mV); p<0.05). A continuación, como puede observarse en la figura 20, perfundimos la preparación con el antagonista muscarínico específico de receptores M3,

4DAMP (0.2nM), observándose una recuperación parcial del componente rápido de la respuesta inhibitoria (Figura 20) ($4.1 \pm 1.7 \text{mV}$); $n=6$; $p<0.05$).

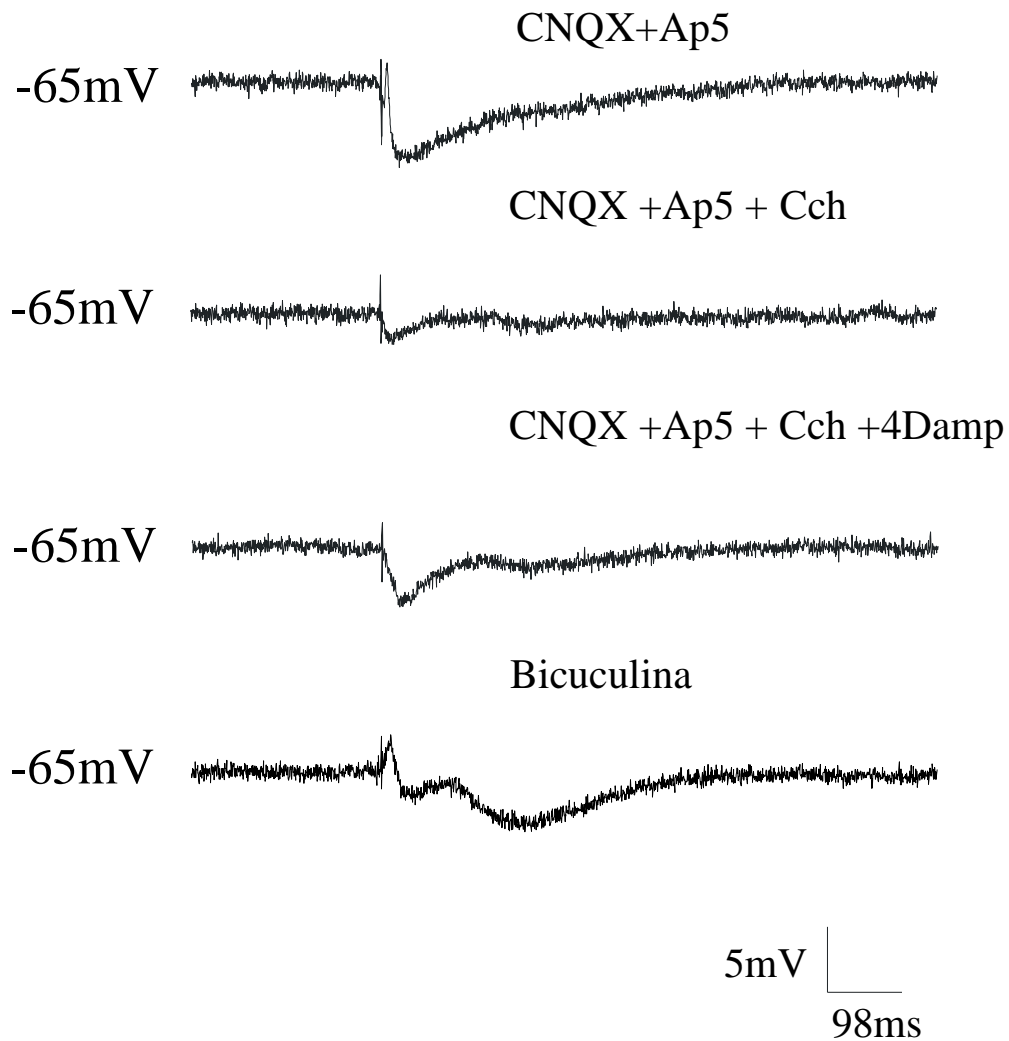


Fig 20.- Caracterización del tipo de receptores implicados en el efecto del carbacol sobre el Potencial inhibitorio postsináptico. Obsérvese que el efecto depresor del carbacol sobre la respuesta evocada es revertido parcialmente por la perfusión con 4DAMP, bloqueante de receptores muscarínicos tipo M1-M3. En el trazado inferior se observa el efecto del bloqueante de receptores GABA tipo A (bicuculina) sobre La actividad inhibitoria evocada. A la izquierda de cada trazado se muestra el valor del potencial de membrana

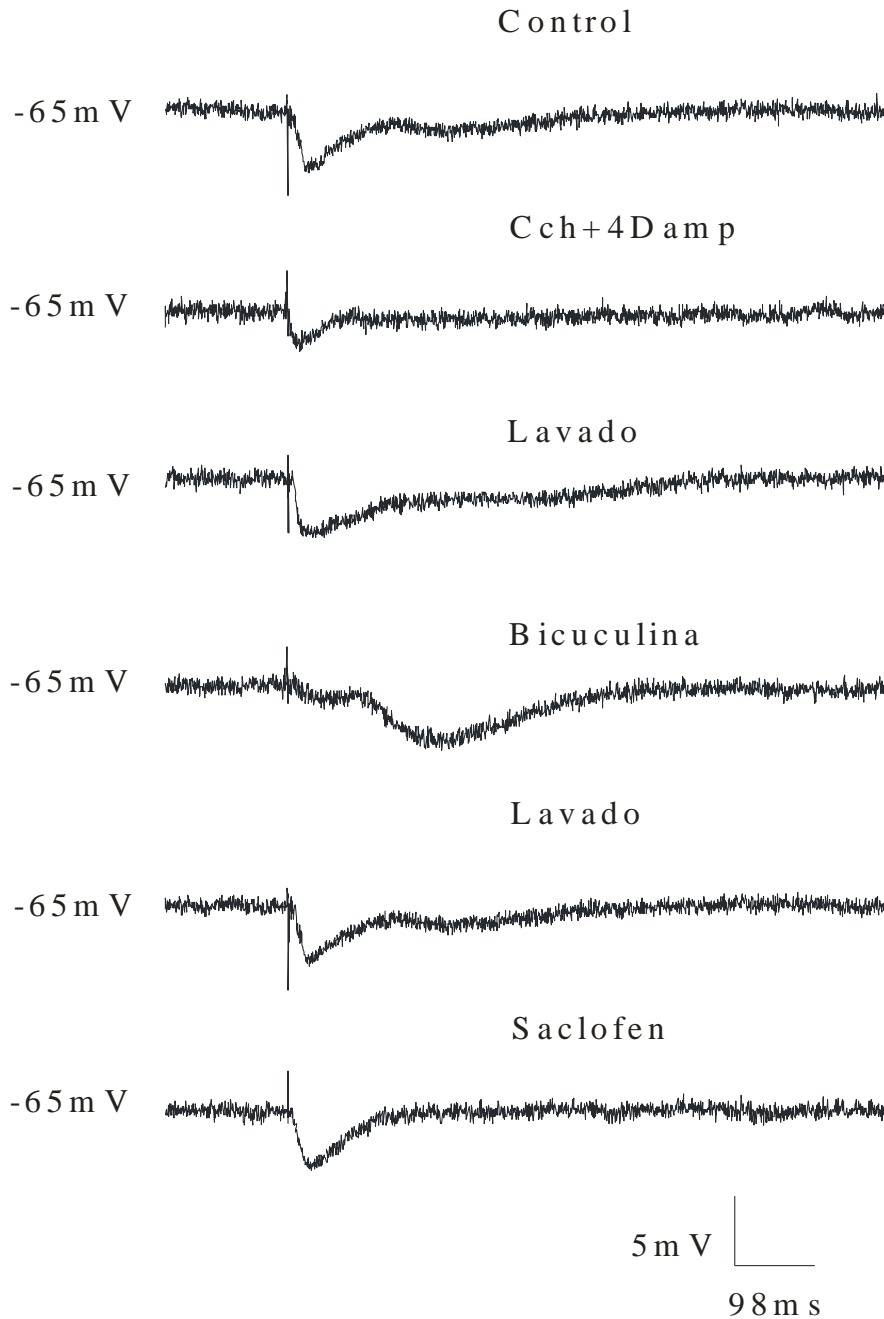


Fig. 21.- Se muestra el efecto de bicuculina y de saclofen sobre la respuesta inhibitoria

Finalmente, cuando lavamos la preparación con bicuculina (30 μ M) desapareció el componente rápido del IPPS (n=5) pudiéndose observarse aún el componente lento del IPPS.

Hemos utilizado también otros bloqueantes específicos de receptores muscarínicos como la gallamina (40 μ M; n=5) y pirenzepina (1 μ M; n=5), antagonistas específicos de receptores muscarínicos M2 y M1 respectivamente y no se encontraron en ninguno de los casos efectos sobre las respuestas inhibitorias.

5.- DISCUSIÓN

En el presente estudio, hemos explorado en qué medida la actividad sináptica inhibitoria evocada en el complejo basolateral de la amígdala tras la estimulación en CE/LA puede ser modulada por la acción colinérgica.

Para ello y previamente, hemos caracterizado electrofisiológicamente las neuronas del complejo basolateral amigdalino. Nuestros resultados indican la existencia de tres tipos celulares característicos desde el punto de vista electrofisiológico y morfológico.

5.1. CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LAS NEURONAS DEL COMPLEJO BASOLATERAL AMIGDALINO

Numerosos autores han estudiado las propiedades y características morfológicas y electrofisiológicas de las neuronas del complejo amigdalino utilizando diferentes técnicas de marcaje y registro intracelular (Chapman y cols, 1990; Rainnie y cols, 1991; Washburn y Moisés 1992; Sugita y cols. 1993; Rainnie y cols. 1993; Yajeya y cols. 1997; Faber y cols, 2001).

Nuestros resultados en este trabajo, en el que hemos tenido en consideración las características de disparo de las células y el curso temporal de los potenciales de acción en las neuronas del complejo basolateral amigdalino, han puesto de relieve la existencia de

tres tipos electrofisiológicamente diferentes, confirman la distribución en tres tipos diferentes de neuronas.

Así, un grupo de ellas presenta a nivel umbral una descarga de tipo *burst*, cuya morfología coincidía con células piramidales amigdalinas. Los potenciales de este *burst* presentaron, tanto en el segundo como en el tercero, en su caso, una disminución en su amplitud y un aumento de su duración. Además, al aumentar la intensidad del pulso despolarizante, el *burst* se seguía de un tren de espigas, todas de la misma amplitud, aumentando la frecuencia de las espigas a medida que aumentaba la despolarización. El tren de potenciales de acción, presentó una cierta tendencia a la acomodación y una marcada hiperpolarización. Todas estas características, definen un grupo neuronal denominado principal tipo piramidal (Tipo I).

Otro tipo neuronal muestra descargas de espigas múltiples despolarizando la neurona a nivel umbral, y presentan una morfología fusiforme. Este segundo grupo de neuronas las caracterizamos como correspondientes al grupo II de Chapman (1990) y Yajeya (1999) que fueron definidas en el apartado de resultados, desde el punto de vista electrofisiológico. La despolarización de estas neuronas, a nivel umbral, generó una respuesta consiste en un tren de potenciales de acción. Cada uno de estos potenciales de acción se seguía de una marcada hiperpolarización y una lenta despolarización hasta alcanzar el umbral. Los sucesivos potenciales de acción no disminuyeron en amplitud ni aumentaron en duración tanto como lo hicieron las neuronas del tipo I. El tren de potenciales de acción presentó habitualmente una rápida acomodación (Fig. 15). Estas características sugieren que se trata de interneuronas de circuito local. Estas neuronas corresponden al tipo II.

Finalmente un tercer grupo lo constituyen aquellas neuronas que al ser despolarizadas a nivel umbral respondían con una espiga única y la identificamos como perteneciente al tipo III o neuronas de tipo *Single Spike* (fig. 16).

Estos resultados encajan con estudios realizados por Chapman y colaboradores (1992), quienes en función de las características electrofisiológicas y del tipo de respuestas obtenidas tras la estimulación, describieron en otras zonas de la amígdala tres tipos celulares que denominaron: *Burst Response*, *Multiple Spike* y *Single Spike*.

Así mismo, otros autores (Rainnie y cols. 1993) identificaron también estos tres tipos morfológicos de células que poseían propiedades electrofisiológicas diferentes en el complejo basolateral amigdalino. Según estos autores el subtipo morfológico de neuronas piramidales, denominado como tipo I presentó potenciales de acción de larga duración y patrones de disparo regular. En cambio, el segundo grupo morfológico de neuronas, estrelladas, incluido en la tipo II presento potenciales de acción de corta duración y patrones de disparo del tipo *burst*, característica similar con la encontrada en el tercer grupo, de morfología multipolar, que se denominó neuronas de tipo III. Neuronas, de características similares a las que mostramos en nuestros resultados.

En nuestro estudio, el tipo II o interneuronas de circuito local, es el más frecuente, presentándose en el 65% (n=67) de las neuronas registradas, mientras que los tipos de células principal tipo piramidal se presentó en el 28% (n=29) y el de espiga única 7% (n=7).

La existencia en el complejo basolateral amigdalino de más de un tipo celular, de acuerdo a sus características electrofisiológicas (potencial de acción y del patrón de descarga) y morfológicas, concuerda también con los datos descritos por Paré y Gaudreau (1996) en la amígdala lateral; Womble y Moisés 1993; Yajeya y cols. 1997) si bien,

Ashenafi y cols. 2005, identifican solo dos tipos de neuronas desde el punto de vista morfológico, tipo I y tipo II manteniendo la clasificación electrofisiológica de los autores anteriores, pero identificando las neuronas tipo *burst* y *single spike* como pertenecientes al mismo tipo morfológico de neurona tipo II, en el complejo basolateral amigdalino.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, demuestran la existencia de estos tres tipos de respuestas en las neuronas del complejo basolateral amigdalino tras la estimulación en Cápsula Externa. (Yajeya y cols., 1997, 1999, 2000). Estos autores describen tres tipos de neuronas que se diferencian en el tipo de respuesta que genera su despolarización a nivel umbral.

La caracterización celular en rodajas atendiendo a las propiedades funcionales de las células es un método adecuado ya que los resultados obtenidos en el presente trabajo son semejantes a los descritos por Pare y Gaudreau (1996) en gatos despiertos. Estos autores identificaron células de proyección con características similares a las neuronas piramidales, e interneuronas con descargas de frecuencia alta, cuyas propiedades eran similares al grupo de interneuronas de circuito local.

A pesar de las discrepancias halladas en cuanto número de neuronas encontradas de un determinado tipo de neuronas más frecuentemente presentes en el complejo basolateral amigdalino, los grupos I y II conjuntamente representan el 93 % de neuronas, como en definitiva presentan los diferentes autores. Además, no se hallaron diferencias significativas en cuanto a la distribución de las células del tipo interneuronas de circuito local y principal piramidal, lo cual nos sugiere que ambos tipos de neuronas se encuentran igualmente distribuidas en esta región amigdalina.

5.2. MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS REGISTRADAS

Los resultados del marcaje de las células estudiadas, muestran que las células marcadas intracelularmente con biocitina presentaron dos tipos morfológicos: bipolar y piramidal. Por un lado, las células identificadas como bipolares correspondieron a neuronas que desde el punto de vista morfológico se clasificaron como interneuronas de circuito local y de espiga única. Por otro, las células con morfología de tipo piramidal, electrofisiológicamente fueron definidas como neuronas principales de tipo piramidal.

Otros autores como Sugita y colaboradores (1993), utilizando la técnica de marcaje con biocitina junto con registro intracelular en ratas, definieron la existencia de varios tipos de neuronas, agrupadas por su morfología y propiedades electrofisiológicas. Sus resultados demuestran tres tipos electrofisiológicos de células, agrupadas morfológicamente como: neuronas piramidales a las células que presentaron postdespolarización y neuronas no piramidales tipo II y III, que presentaron posthiperpolarización de larga y corta duración respectivamente.

Estos resultados concuerdan con los encontrados por Ashenafi y colaboradores (2005) que describían dos claros tipos morfológicos, si bien desde el punto de vista electrofisiológico, también describían tres tipos de neuronas. Similares resultados a los encontrados en nuestro estudio.

Por otro lado, en estudios realizados en humanos, otros autores (Tosevski y cols., 2002), clasificaron las neuronas del complejo basolateral amigdalino mediante la técnica del Golgi y encontraron tres tipos de neuronas: neuronas tipo I, que denominó como –piramidales-, neuronas tipo II definidas por ellos como –células piramidales modificadas-,

y neuronas tipo III -consideradas como células no piramidales-. Estos autores muestran discrepancias con nuestros resultados, si bien hay que tener en cuenta que el estudio es en humanos y que las técnicas para el estudio morfológico es diferente al utilizado en nuestro estudio. A pesar de ello, existen similitudes entre ambos estudios. Ellos diferencian dos tipos de células, por un lado células piramidales con características diferentes y otro de células no piramidales.

5.3. ACTIVIDAD SINÁPTICA EVOCADA

El complejo amigdalino recibe importantes aferencias desde diferentes estructuras del sistema nervioso central. La cápsula externa ocupa un lugar significativo como vía de acceso de estas aferencias a las neuronas de la amígdala. Diversos autores (Yajeya y cols, 2000; Meis y Pape, 2001; Chapman y cols. 1992; Li y cols., 1998) han demostrado que la estimulación de la cápsula externa evoca en las neuronas amigdalinas potenciales postsinápticos tanto excitatorios como inhibitorios existiendo una relación directa entre la amplitud de las respuestas con la intensidad del estímulo y su modificación tras la aplicación de fármacos.

5.3.1.- RESPUESTAS SINÁPTICAS DE LAS NEURONAS DEL COMPLEJO BASOLATERAL AMIGDALINO

La estimulación de aferencias al núcleo basolateral procedentes de CE y L.A., generó dos tipos de respuesta en el núcleo basolateral amigdalino: una es la clásica

respuesta trifásica que aparece tras la estimulación tanto en CE como LA, y otro tipo de respuesta consistente en una respuesta postsináptica inhibitoria con dos componentes, ambos inhibitorios y de distinto curso temporal. También hemos registrado en el núcleo basolateral actividad espontánea de tipo inhibitorio.

En relación con el tipo de respuesta más frecuentemente observada consistente en tres componentes, un componente excitatorio seguido de dos componentes inhibitorios. El componente excitatorio de las respuestas de las neuronas del BLA tras la estimulación en (EC/LA) fue completamente bloqueado tras la perfusión con CNQX (antagonista competitivo de receptores AMPA/Kainato) y AP5 (antagonista potente y selectivo de los receptores glutamatérgicos NMDA), lo que nos indica que en nuestras condiciones de registro, la transmisión sináptica es mediada por glutamato actuando sobre receptores AMPA/Kainato. El carácter glutamatérgico de esta respuesta ha sido también puesto de manifiesto por otros autores (Ashenafi, 2005; Yajeya, 2000; Faber y cols., 2005; Sah, 2003; Washburn, 1992).

En cuanto a los dos componentes inhibitorios de esta respuesta, nuestros resultados muestran que la respuesta postsináptica inhibitoria registrada en las neuronas piramidales del BLA se bloquea utilizando antagonistas GABAérgicos. En concreto, la perfusión de la preparación experimental con bicuculina, que es un antagonista competitivo de receptores GABA_A, bloqueó el componente más rápido del IPSP-rápido. Sin embargo, la perfusión con Saclofén, que es un antagonista selectivo de receptores GABA_B no modificó este componente rápido de la respuesta inhibitoria, lo que sugiere que el primer componente de la respuesta esta mediado por activación de receptores de tipo GABA_A. Sin embargo, el Saclofen sí bloqueó el componente tardío del IPSP-lento, lo que sugiere que esta respuesta está mediada por receptores de tipo GABA_B. Estos resultados indican que la respuesta compleja de tipo inhibitorio registrada en las células piramidales del basolateral

amigdalino está mediada por activación de ambos tipos de receptores GABA_A y GABA_B. Este tipo de respuesta compleja ha sido previamente descrita en otras regiones cerebrales incluyendo el hipocampo (Alger y Nicoll, 1982; Fujiwara-Tsukamoto y cols. 2007; Janigro y Schwartzkroin, 1988), corteza (Connors y cols., 1988, tálamo (Crunelli y cols., 1988) y también en amígdala (Washburn, 1992).

Diversos autores han demostrado que el componente inhibitorio rápido (IPSP-rápido) parece implicar a receptores de tipo GABA_A, aumentando la conductancia al cloro, mientras que el componente inhibitorio lento de la respuesta (IPSP-lento) depende de un aumento en la conductancia al potasio mediada a través de receptores GABA_B (Washburn, 1992). Estos resultados concuerdan con la medida de los potenciales de inversión de la actividad inhibitoria espontánea (componente rápido: $-75 \pm 2\text{mV}$; componente lento $-90 \pm 3\text{mV}$), lo que encaja con la mediación a través de receptores GABA_A y GABA_B de los dos componentes de la respuesta inhibitoria respectivamente (Washburn y Moises, 1992).

Al igual que otros autores (Washburn y Moises, 1992; Yajeya y cols., 1997, 2000), la aplicación del agonista colinérgico Carbacol (10-20 μM), genera en las neuronas amigdalinas un efecto postsináptico que consiste en la mayoría de las ocasiones en una lenta despolarización. Este efecto es mediado por la activación de receptores postsinápticos de tipo muscarínico. Sin embargo, y como expusimos en el apartado de resultados, en nuestros experimentos registramos el potencial de membrana y la respuesta evocada EPSP/IPSP durante ocho a quince minutos observando que la amplitud del IPSP se redujo antes de que se detectasen modificaciones en la resistencia de la membrana y en el potencial de reposo de la membrana. Por tanto, los efectos del carbacol sobre la membrana postsináptica pueden no intervenir en la reducción de la amplitud de la respuesta postsináptica evocada EPSP/IPSP.

Estos resultados sugieren que el carbacol tiene un doble efecto sobre las neuronas del complejo amigdalino: actuando sobre receptores postinápticos de tipo muscarínico, despolarizando la célula, y actuando sobre receptores a nivel presináptico, deprimiendo la transmisión inhibitoria mediada por el ácido glutámico, a través de receptores AMPA/kainate que median la transmisión gabaérgica en la amígdala.

5.3.2.- CARACTERIZACIÓN DEL SUBTIPO DE RECEPTOR MUSCARÍNICO QUE MEDIA LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA SINÁPTICA INHIBITORIA

La perfusión con el agonista muscarínico carbacol provoca una poderosa supresión de la respuesta postsináptica inhibitoria IPSP en las neuronas amigdalinas, disminuyendo marcadamente la amplitud de los dos componentes del IPSP evocados por estimulación de CE/LA (IPSP-rápido y IPSP-lento). El hecho de que la atropina, que es un antagonista competitivo del receptores muscarínicos, bloquee este efecto sugiere que el efecto colinérgico resulta de activación muscarínica. Un posible mecanismo puede ser por una disminución en la resistencia de entrada de la membrana en la célula postsináptica, lo que dispararía y después deprimiría el IPSP. Observamos, sin embargo, que en la mayoría de las células postsinápticas, la resistencia de entrada permanece sin cambios mientras se observaba el efecto supresivo. Todos estos hallazgos nos indican una acción presináptica del carbacol.

Este tipo de efecto ha sido también descrito en hipocampo en ratas (Ben-Ari, 1981; Haas, 1982; Pitler, y Alger, 1992; Dutar y Nicoll, 1988; Sheridan y Sutor, 1990), en corteza (Hasselmo y Bower, 1992), en estriado (Hsu y cols., 1995), en septum y en el

núcleo dorsolateral septal (Hasuo y cols., 1988) en base del encéfalo (Szerb y cols., 1994), e incluso en amígdala (Wasburn y Moises, 1992c; Yajeya y cols., 1997, 1999, 2000).

En definitiva, el efecto supresor presináptico del carbacol observado en este trabajo, y de su acción postsináptica, parece sugerir que las células piramidales de la amígdala se encuentran bajo un extenso control colinérgico (Washburn and Moises, 1992; Yajeya et al., 2000).

Con el objetivo de identificar el subtipo específico de receptor muscarínico que media el efecto supresor sobre la neurotransmisión inhibitoria, hemos utilizado diferentes drogas bloqueantes específicas de receptores muscarínicos.

Por un lado hemos utilizado Gallamina que es un antagonista específico de receptores muscarínicos M₂. La perfusión con Gallamina no generó efecto alguno sobre la respuesta inhibitoria postsináptica.

Sin embargo, en este estudio, el efecto depresor del carbacol (10µM) sobre la respuesta inhibitoria a la estimulación de CE y LA fue revertido mediante la perfusión con 4-DAMP (1 µM), que es un antagonista específico de receptores muscarínicos M₃, lo que sugiere que la depresión muscarínica de la respuesta inhibitoria era mediada por activación de receptores de tipo M₃. Este mecanismo no es exclusivo en amígdala ya que ha sido observado, por ejemplo, en neuronas dopaminérgicas de la región mesencefálica (Michel, 2004).

El hecho de que en nuestros resultados, el efecto generado por el 4DAMP sea parcial, nos sugiere la implicación de varios subtipos de receptores muscarínicos en la modulación de la neurotransmisión inhibitoria en el complejo basolateral de la amígdala.

La posibilidad de que el carbacol pueda modular la neurotransmisión inhibitoria utilizando diferentes tipos de receptores concuerda con resultados como los descritos en la corteza olfatoria por Bagetta y Constanti (1990) quienes encontraron que el carbacol deprime la neurotransmisión de tipo excitatorio mediante activación de receptores muscarínicos presinápticos de tipo M₁. Sin embargo, en el núcleo acumbens, estriado y amígdala, Sugita y cols., (1991, 1993) sugieren que la acción de antagonistas selectivos en la supresión muscarínica de respuestas sinápticas excitatorias era consecuente con un mecanismo M₃, mientras que no lo era con la implicación de receptores M₄ o M₅. En neuronas corticales, Kimura and Baughman, (1997) mostraron que receptores muscarínicos de tipo M₄ mediaban el efecto supresor del carbacol sobre el EPSP y que eran receptores específicos tipo M₁ los que mediaban el efecto supresor del carbacol sobre el IPSP. Hsu y colaboradores (1995) también se muestran a favor de un mecanismo mediado a través de receptores M₃ en relación con el efecto supresor muscarínico en este caso, del EPSP en el estriado.

Sheridan and Sutor (1990) mostraron que la acción presináptica inhibitoria del carbacol en la región CA1 del hipocampo estaba mediada por receptores muscarínicos del subtipo M₁. Estas diferencias que encontramos en la bibliografía pueden ser consecuencia del hecho de que fibras diferentes expresan o pueden expresar distintos tipos de receptores muscarínicos, y que cada célula puede expresar simultáneamente más de un subtipo de receptor muscarínico (Hulmen y cols., 1990).

Otra posibilidad, que no se debe descartar, es que los agentes farmacológicos que existen en el mercado no son lo suficientemente selectivos como para discriminar rotundamente un tipo particular de receptor (Dorje et al., 1991).

Por último, la respuesta muscarínica aislada era revertida completamente mediante la perfusión del tejido con bicuculina y saclofen, demostrando con ello la naturaleza GABAérgica del IPSP. El sustrato anatómico de estos mecanismos ha sido sugerido por estudios inmunocitoquímicos que revelan la existencia de fibras terminales ChAT-inmunorreactivas en aposición cercana a sinapsis entre terminales GABAérgicos y el soma de células piramidales en el complejo BLA (Carlsen, 1988, 1989; Nitecka y Frostcher, 1989).

5.3.3.- CONSECUENCIAS FUNCIONALES DE LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES GABA_A Y GABA_B EN EL BLA

Existen otras estructuras en el Sistema Nervioso Central, que también poseen estos dos tipos de IPSPs de manera similar a los que encontramos en el BLA. Se han encontrado en hipocampo (Alger 1984; Davies et al., 1990; Lambert et al., 1989; McCarren y Alger 1985), en el núcleo geniculado lateral (Turner 1990; Crunelli et al. 1988; Soltesz et al. 1989), en el septum lateral (Stevens et al., 1987), en corteza y neocortex (Connors et al. 1988; Howe et al., 1987; Tseng y Haberly 1988). Aunque las características de los dos tipos diferentes de IPSPs encontrados en estas áreas poseen características específicas en cada tipo de célula, dada la semejanza entre las regiones del cerebro, parece razonable asumir que los IPSPs jueguen papel funcional similar en todas estas regiones (Rainnie y cols., 1991b).

La gran disminución de la resistencia y el posible origen somático del f-IPSPs, sugiere que las neuronas del BLA se inhibirán de forma eficaz por estímulos excitatorios. Las características de estos (IPSP-lento), del inicio rápido y de corta duración, permiten un

ajuste preciso de la respuesta neuronal ante estímulos excitatorios. Por el contrario, el pequeño aumento de la conductancia y asociada a una larga duración con el IPSP-lento podría indicar que estos estímulos sólo podrían regular los estímulos excitatorios de baja frecuencia durante el funcionamiento neuronal (Rainnie y cols., 1991a,b). A conclusiones similares llegó Soltesz y colaboradores (1989). Además, estos autores encontraron que los IPSP-rápido serían los determinantes primarios de la sincronización en la BLA. En la misma línea, esta apreciación coincide con los resultados de los trabajos de Traub y colaboradores (1987), quienes demostraron, en un modelo computarizado de la región CA3 del hipocampo, que son necesarios los IPSP-rápido para bloquear la actividad excitatoria tipo *burst*, mientras que los IPSP-lento podría bloquear el desarrollo completo de la sincronización.

En nuestro estudio, debido a que la transmisión sináptica en el BLA tiene ambos tipos de respuesta inhibitoria, tanto un IPSP-rápido, mediado por GABA_A, como un componente inhibitorio lento, IPSP-lento, mediado por GABA_B, cualquier reducción en la expresión de uno o ambos de estos potenciales puede mover al núcleo basolateral hacia un estado que favorezca cuadros epilépticos, como defienden Rainnie y cols. (1991b). Concluyendo, la complejidad del circuito sináptico inhibitorio dentro el BLA sugiere que la modulación de esta inhibición puede jugar un papel clave en las probables propiedades integrativas del BLA.

6.- CONCLUSIONES.

1.- Nuestros resultados indican la existencia en el BLA de tres tipos celulares caracterizados desde el punto de vista electrofisiológico, que se corresponden con dos tipos de neuronas caracterizadas morfológicamente.

2.- La estimulación de aferencias al BLA procedentes de CE y LA, generó dos tipos de respuesta en el núcleo basolateral amigdalino: una es la clásica respuesta trifásica con un componente excitatorio seguido de dos componentes inhibitorios, y otro tipo de respuesta consistente en una respuesta postsináptica inhibitoria con dos componentes de distinto curso temporal.

3.- El componente excitatorio de las respuestas de las neuronas del BLA tras la estimulación en (EC/LA) fue bloqueado completamente tras la perfusión con CNQX y AP5, lo que indica que la transmisión sináptica estaría mediada por glutamato actuando sobre receptores AMPA/Kainato.

4.- La respuesta compleja de tipo inhibitorio registrada en las células piramidales del BLA está mediada por activación de ambos tipos de receptores GABA_A (al ser bloqueada por bicuculina) y GABA_B (al ser bloqueada por saclofen).

5.- La aplicación del agonista colinérgico Carbacol (10-20 μ M), genera en las neuronas del BLA un efecto postsináptico consistente en una lenta despolarización mediada por la activación de receptores postsinápticos de tipo muscarínico.

6.- Los efectos del carbacol sobre la membrana postsináptica sugieren que el carbacol tiene un doble efecto sobre las neuronas del BLA: 1) actuando sobre receptores postsinápticos de tipo muscarínico, despolarizando la célula, y 2) actuando sobre receptores a nivel presináptico, deprimiendo la transmisión inhibitoria mediada por el ácido glutámico, a través de receptores AMPA/kainate que median la transmisión gabaérgica en la amígdala.

7.- La respuesta postsináptica inhibitoria (IPSP) en las neuronas del BLA es inhibida por la perfusión con el agonista muscarínico carbacol lo que sugiere que el efecto colinérgico resulta de activación muscarínica, ya que éste es a su vez bloqueado por atropina.

8.- El efecto depresor del carbacol ($10\mu\text{M}$) sobre la respuesta inhibitoria a la estimulación de CE y LA fue revertido mediante la perfusión con 4-DAMP ($1\mu\text{M}$), que es un antagonista específico de receptores muscarínicos M_3 , lo que sugiere que este efecto es mediado por activación de receptores de tipo M_3 .

9.- Las respuestas inhibitorias se revertían completamente mediante la perfusión del tejido con bicuculina, en el caso del f-IPSP y con saclofen, en el caso del s-IPSP, demostrando con ello la naturaleza GABAérgica de la respuesta.

7.- BIBLIOGRAFÍA

Aggleton, J.P. y Passingham, R.E., (1981) Syndrome produced by lesions of the amygdala in monkeys (*Macaca mulatta*), *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **95**: 961–977.

Aggleton, J.P. (1992) The functional effects of amygdala lesions in humans: A comparison with findings from monkeys. En J.P. Aggleton (Ed). *The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction* (pp. 485-503). New York, Wiley-Liss.

Aggleton, J.P., Burton, M.J. y Passingham R.E. (1980). Cortical and subcortical afferents to the amygdala of the rhesus monkey (*Macaca Mulatta*). *Brain Res.*, **190**: 347-368.

Aggleton, J.P. (1985). A description of intra-amygdaloid connections in old world monkeys. *Exp. Brain Res.*, **57**: 390-399.

Alger, B.E., y Nicoll, R.A. (1982). Feed-forward dendritic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro. *J. Physiol. (London)*, **328**: 105–123.

Alger, B.E. (1984). Characteristics of a slow hyperpolarising synaptic potential in rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J. Neurophysiol.*, **52**: 892-910.

Alvarez-Bolado, G., Rosenfeld, M.G. y Swanson, L.W. (1995). Model of forebrain regionalization based on spatiotemporal patterns of POU-III homeobox gene expression, birthdates, and morphological features. *J. Comp. Neurol.* **355**: 237–295

Alvarez-Bolado, G. y Swanson, L.W. (1996). *Developmental Brain Maps: Structure of the Embryonic Rat Brain*, Amsterdam: Elsevier.

Amaral, D.G., Avendaño, C. y Benoit, R. (1989). Distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the monkey amygdala. *J Comp Neurol.* 284(2): 294-313.

Amaral, D. G., Price, J.L., Pitkamen, A. y Carmichael, S. T. (1992) Anatomical organization of the primate amygdala. In: *Neurobiological aspects of emotion, Memory and mental dysfunctions* (pp. 1-66). Aggleton. Wiley-Liss: New York.

Armstrong, E. (1991). The limbic system and culture. An allometric analysis of the neocortex and limbic nuclei. *Human Nature* 2(2): 117-136.

Aroniadou-Anderjaska, V., Qashu, F. y Braga, M.F. (2007). Mechanisms regulating GABAergic inhibitory transmission in the basolateral amygdala: implications for epilepsy and anxiety disorders; *Amino Acids*. 32(3): 305-315.

Aronson, L.R. y Cooper, M.L. (1979). Amygdaloid hypersexuality in male cats re-examined. *Physiology & Behavior*, **22**: 257-265

Ashenafi, S., Fuente, A., Criado, J.M., Riolobos, A.S., Heredia, M. y Yajeya, J. (2005). Beta-amyloid peptides₂₅₋₃₅ depresses excitatory synaptic transmission in the rat basolateral amygdala “in vitro.” *Neurobiol. Aging*, **26**: 419-428.

Ayoub, D.M., Greenough, W.T. y Juraska, J.M. (1983). Sex differences in dendritic structure in the preoptic area of the juvenile macaque monkey brain. *Science*, **219**: 197-198.

Bagetta G. y Constanti A. (1990). Muscarinic suppression of the evoked N-wave by oxotremorine-M recorded in the guinea-pig olfactory cortex slice. *European Journal of Pharmacology*, 178(1): 91-96.

Baxter, M.G. y Murray, E.A. (2002). The amygdala and reward. *Nature Reviews Neuroscience* **3**: 563-573.

Beeckmans, K. y Michiels, K. (1996). Personality, emotions and the temporolimbic system: a neuropsychological approach. *Acta Neurol. Belg.*, 96(1): 35-42.

Ben-Ari, Y., Le Gal La Saile, G. y Champagna, J.C. (1974). Lateral amygdala unit activity: I. Relationship between spontaneous and evoked activity. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 37: 449-461.

Ben-Ari, Y., Kanazawa, I. y Zigmond, R.E. (1976). Regional distribution of glutamate decarboxylase and GABA within the amygdaloid complex and stria terminalis system of the rat. *J. Neurochem.*, **26**: 1279-1283.

Ben-Ari, Y. (1981). Transmitters and modulators in the amygdaloid complex: A review Y. Ben-Ari (Ed.) Inserm symposium 20: “The amygdaloid complex”. 163-174.

Ben-Ari, Y., Zigmond, R.E., Shute C.C. y Lewis, P.R. (1977). Regional distribution of choline acetyltransferase within the amygdaloid complex and stria terminalis system. *Brain Res.*, **120**: 435-445.

Bente, D. y Kluge, E. (1953). Sexuelle Reizzustände im Rahmen des Uncinatus-Syndroms. *Arch. Psychiat. U. Ztschr. F. D. Ges. Neurol.* **190**: 357–376.

Björklund, A. y Lindvall O. (1984). Classical Neurotransmitters in the CNS. En: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Amsterdam: Elsevier, 2(1), 55-122.

Bobiller, P., Seguin, S., De Gueurce, A., Lewis B.D. y Pujol, J.F. (1979). The efferent connections of the nucleus raphe centralis superior in the rat as revealed by radioautography. *Brain Res.*, **166**: 1-8.

Björklund A., Lindvall O. (1984). Classical neurotransmitters in the CNS. En: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Amsterdam: Elsevier. 2(1): 277-386.

Bower, G.A. (1967). A multicomponent theory of the memory trace. En: *The Psychology of learning and motivation* (Vol. 1). K.W. Spence and J.T. Academic Press, New York.

Bresnahan, E. y Routtenberg, A. (1972). Memory disruption by unilateral, low level sub-seizure stimulation of the medial amygdaloid nucleus. *Physiology and Behavior*, **9**: 513-525.

Brierly, J.B., Corsellis, J.A.N., Hierons, R. (1969). Subacute encephalitis of later adult life mainly affecting the limbic areas. *Brain*. **83**: 356–368.

Buckley N.J., Bonner T.I. y Brann M.R. (1988). Localization of a family of muscarinic receptor mRNAs in rat brain. *J. Neuroscience*, **8**: 4646–4652.

Kaada, B.R. (1972). Stimulation and regional ablation of the amygdaloid complex with reference to functional representations. En: *The Neurobiology of the Amygdala* (pp. 205-282), B.E. Eleftheriou, (Ed.), Plenum Press, New York.

Caffé, A.R., Van Ryen, P.C., Van Der Woude, T.P. y Van Leerwen, F.W. (1989) Vasopressin and oxytocin systems in the brain and upper spinal cord of *Macaca fascicularis*. *J. Comp. Neurol.* **287**: 302-325.

Cahill, L. y Van Stegeren, A. (2003). Sex-related impairment of memory for emotional events with beta-adrenergic blockade. *Neurobiol Learn. Mem.* 79(1): 81-88.

Canteras N. S., Simerly R. B., Swanson L. W. (1992). Connections of the posterior nucleus of the amygdala. *J. Comp. Neurol.* **324**: 143–179.

Carlsen, J., Zaboorsky, L. y Heimer, L. (1985) Cholinergic projections from the basal forebrain to the basolateral amygdaloid complex: A combined retrograde fluorescent and immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.* **234**: 155-167.

Carlsen J. (1988) Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in the rat basolateral amygdaloid nucleus, with special reference to GABAergic innervation of amygdalostriatal projection neurons. *J. Comp. Neurol.* **273**: 513-526.

Carlsen, J. (1989) New perspectives on the functional anatomical organization of the basolateral amygdala. *Acta Neurol Scand.*, **79**: 5-27.

Carlsen J, Heimer L (1988) The basolateral amygdaloid complex as a cortical-like structure. *Brain Res.*, **441**: 377-380.

Carlsen, J., Zaborszky, K. y Heimer, L. (1995). Cholinergic projections from the basal forebrain to the basolateral amygdaloid complex: A combined retrograde fluorescent and immunohistochemical study. *J. Comp. Neuro.* **234**: 155-167.

Carrillo, A.J., Rabii, J., Carrer, H.F. y Sawyer C.H. (1977). Modulation of the proestrous surge of luteinizing hormone by electrochemical stimulation of the amygdala and hippocampus. *Brain Res.*, **128**: 81–92.

Chapman, P. E., Kairisis, C., Keenan, y Brown T. (1990). Long-term synaptic potentiation in the amygdala. *Synapse.* **6**: 271-278.

Cherry, J.A. y Baum, M.J. (1990). Effects of lesions of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic/anterior hypothalamic area on the expression of androgen- and estrogen-dependent sexual behaviors in male ferrets. *Brain Res.*, **522**: 191-203.

Colino, A. y Halliwell, J.V. (1993). Carbachol potentiates Q current and activates a calcium-dependent non-specific conductance in rat hippocampus in vitro. *Eur. J. Neurosci.*, **5**: 1198–1209

Connors, B.W., Malenka, R.C. y Silva, L.R. (1988). Two inhibitory postsynaptic potentials, and GABA_A and GABA_B receptor-mediated responses in neocortex of rat and cat. *J. Physiol. (London)*, **406**: 443-468,

Coover, G., Ursin, H. y Levine S. (1973). Corticosterone and avoidance in rats with basolateral amygdala lesions. *J. Comp. and Physiol Psychol*, **23**: 1109–1117.

Cornish K.G. y Hall, R.E. (1979). Heart rate changes caused by chemical stimulation of the amygdaloid body. *Physiol. Behav.*, **22**: 947-954.

Cowan, W.M-, Raisman, G. y Powell, T.P. (1965). The connexions of the amygdala. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry.*, **28**: 137-51.

Cross J.D. y Goodman I.J. (1982). Modified retention of punishment with unilateral, single-pulse stimulation of amygdala but not hippocampus. *Physiological Psychology*, **10**(4): 417-421.

Crunelli V., Haby, M., Jassik-Gerschenfeld, D., Leresche, N. y Oirchio, M. (1988). Cl⁻ and K⁺ -dependent inhibitory postdynaptic potentials evoked by interneurons of the rat lateral geniculate nucleus. *J. Physiol. (London)*, **399**: 153-176.

Davies, C.H., Davies, S.N. y Collingridge, G.L. (1990). Paired-pulse depression of monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic responses in rat hippocampus. *J. Physiol. (London)*, **424**: 513-531.

Delgado-García, J.M. y Mir, D. (1974). Relationships between amygdala and hippocampus determined by after-discharges. *Revista Española de Fisiología*, **30**(4): 261-268.

Devor, M. (1973). Components of mating dissociated by lateral olfactory tract transectioa in male hamsters. *Brain Res.*, **64**: 437-441.

Deutch, A.Y. (1993). Prefrontal cortical dopamine systems and the elaboration of functional corticostriatal circuits: implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission / General Section JNT*. **91**(2): 197-221.

Douglas R.J. y Pribram K.H. (1966). Learning and limbic lesions. *Neuropsychologia*, **4**: 197-220.

Dorje, F., Wess, J., Lambrecht, G., Tacke, R., Mutschler, E. y Brann, M.R. (1991). Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **256**: 727–733.

Donoghue, J. y Herkenham, M. (1985) Neostriatal projections from individual cortical fields to chemically distinct compartments. *Science*. **4**: 455-461.

Dreifuss, J.J. y Kelly, J.S. (1972). Recurrent inhibition of antidromically identified rat supraoptic neurones, *J. Physiol. (London)*, **220**: 87-103.

Dreifuss, J.J., y Murphy, J.T. (1968). Convergence of impulses upon single hypothalamic neurons. *Brain Res.*, **8**: 167-176.

Dutar, P. y Nicoll, R.A. (1988). A physiological role for GABA_B receptors in the central nervous system. *Nature*, 332, p. 156.

Egger, D.M. (1967). Amygdaloid-Hypothalamic Neurophysiological Interrelationships. En: *The Neurobiology of the Amygdala*, **2**: 319-342.

Faber, E.S.L., Callister, R.J. y Sah, P. (2001). Morphological and electrophysiological properties of principal neurons in the rat lateral amygdala in vitro. *J. Neurophysiol.* **85**: 714–723.

Faber, E.S.L., Delaney, A.J. y Sah, P. (2005). SK channels regulate excitatory synaptic transmission and plasticity in the lateral amygdala. *Nat. Neurosci.*, **8**: 635-641.

Fallon, J.H., Koziel, D.A. y Moore, R. (1978). Catecholamines innervation of the basal forebrain II, Amygdala, Suprarhinal and entorhinal cortex. *Journal of comparative Neurology*, **180**: 509-532.

Fallon, J.H. y Philippe, C. (1992) Distribution of monoamines within amygdala: In. (Ed.) *The amygdala: Neurobiological aspects of emotion* (pp. 97-114). Wiley-Liss.

Fallon, J. H., y Loughlin S. E. (1981). Substantia nigra and ventral tegmental area neurons: Contrasts in axonal branching to the limbic, striatal and cortical systems. *Anat. Rec.* 199: 79a.

Fallon, J.H. y Loughin, S.E. (1985) Substantia nigra. In G. Paxinos (Ed.): "The rat central nervous system." Amsterdam. Elsevier. **1**: 353-374.

Fernández de Molina A. y Hunsperger R.W. (1959). Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis, and adjacent structures. *J. Physiol. (London)*, 145(2): 251-265.

Fernández de Molina A. y Hunsperger R.W. (1962). Organization of the subcortical system governing defense and flight reactions in the cat. *J. Physiol. (London)*, 160(2): 200-213.

Fernández de Molina A. y Ruiz Marcos A. (1967). A study on the neuronal activity in the amygdaloid projection field. *Trabajos del Instituto Cajal de investigaciones biológicas*, **59**: 137-51.

Fernández de Molina, A., Yajeya, J., Colino, A., y Velasco J. (1981). Cyclic hyperpolarising activity in amygdaloid neurons and limbic epilepsy. En: *The Amygdaloid Complex* (pp. 465-474). (Ed.) Y. Ben-Ari. Amsterdam: Elsevier/North-Holland.

Fernando, M.G., Alino, M.M. y Enrique, L. (2002). The pallial amygdala of amniote vertebrates : Evolution of the concept, Evolution of the structure. *Brain Res. Bulletin*. **57**: 463-469.

Fiberger, H.C. (1982). The organ and some projections of cholinergic neurons of the mammalian forebrain. *Res. Rev.* **4**: 327-288.

Fujiwara-Tsukamoto, Y., Isomura, Y., Imanishi, M., Fukai, T. y Takada, M. (2007). Distinct types of ionic modulation of GABA actions in pyramidal cells and interneurons during electrical induction of hippocampal seizure-like network activity. *European Journal of Neuroscience*, **25**: 2713–2725.

Gallager, M. and Schoenbaum, G. (1999). Functions of the Amygdala and Related Forebrain Areas in Attention and Cognition. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **877**: 397-411.

Garris, P.A. y Wightman, R.M. (1994). Different kinetics govern dopaminergic transmission in the amygdala, prefrontal cortex, and striatum: an in vivo voltammetric study. *The Journal of Neuroscience*, 14(1): 442-450;

Gean, P.W., Shinnick-Gallagher, P. y Anderson, A.C. (1989). Spontaneous epileptiform activity and alteration of GABA- and of NMDA-mediated neurotransmission in amygdala neurons kindled in vivo. *Brain Res.*, **494**: 177–181.

Gloor, P. (1955). Inputs and Outputs of the Amygdala: What the Amygdala is Trying to Tell the Rest of the Brain. En: *Limbic Mechanisms* (pp. 189-209). Springer.

Gloor, P. (1972). Temporal Lobe Epilepsy: Its Possible Contribution to the Understanding of the Functional Significance of the Amygdala and of Its Interaction with Neocortical-Temporal Mechanisms. *The Neurobiology of the Amygdala*, **2**: 423-457.

Goddard, G. (1964). Functions of the amygdala. *Psychol. Bull.* **62**: 89–109.

Groenewegen, H. y Van Dijk, C. (1984) Efferent projections of the ventral pallidum in the rats studied with the anterograde transport of the lecitin phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L). *Neuroscience letters. Suppl.*, S58.

Gründemann, J. y Lüthi, A. (2015). Ensemble coding in amygdala circuits for associative learning. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **35**: 200-206.

Haas, H.L. (1982). Cholinergic disinhibition in hippocampal slices of the rat. *Brain Res.*, **233**: 200-204.

Haber, S., Held, R. (1982). The distribution of immunoreactive fibers and terminals in the monkey central nervous system: An immunohistochemical study. *Neuroscience*. **7**: 267-280.

Halgren, E., Squires, N.K., Wilson C.L., Rohrbaugh J.W., Babb T.L. y Crandall P.H. (1980). Endogenous potentials generated in the human hippocampal formation and amygdala by infrequent events. *Science*, 210(4471): 803-805.

Halgren, E. (1981). The amygdale contribution to emotion and memory. In Y. Ben-Ari (ED.), *The Amygdaloid Complex* (pp. 395-408). Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

Halliwel, J.V. (1989). Cholinergic responses in human neocortical neurones. In: Central Cholinergic Synaptic Transmission. M. Frotscher et al. (Ed.). *Experientia Supplementum*, **57**: 138-149.

Hall, E. (1972). Some aspects of the structural organization of the human amygdala In: *The neurobiology of the amygdala* (pp. 95-122). B.E. Elftheriou (Ed.). Plenum press: New York.

Harrison, P.J. (1999). The neuropathology of schizophrenia: A critical review of the data and their interpretation. *Brain*. **122**: 593-624.

Hasuo, H., Gallager, J.P. y Shinnick-Gallagher, P. (1988). Disinhibition in the rat septum mediated by M11 muscarinic receptors. *Brain Res.*, **438**: 323-327.

Hasselmo, M.E. y Bower, J. M. (1992). Cholinergic suppression specific to intrinsic not afferent fiber synapses in rat piriform (olfactory) cortex. *J. Neurophysiol.* **67**: 1222 – 1229.

Heimer, L. y Nauta W.J. (1969) The hypothalamic distribution of the stria terminalis in the rat. *Brain Res.*, 13(2): 284-97.

Hemphill, M., Holm, G., Crutcher, M., DeLong, M., Hedreen, J., 1981, Afferent connections of the nucleus accumbens in the monkey, En: *The Neurobiology of the Nucleus Accumbens* (pp. 75–81), (Ed.) R.B. Chronister, J.F. DeFrance, Maine: Haer Institute, Brunswick.

Hendry, S.H.C., Jones, E.G. y Emson, P.C. (1984). Morphology, distribution and synaptic relations of Somatostatin and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in rat and monkey neocortex. *J. Neurosci.* **4**: 2497-2512.

Hökfelt T., Johansson O. y Goldstein M. (1984). Central catecholamine neurons as revealed by immunohistochemistry with special reference to adrenaline neurons. En: *Handbook of chemical neuroanatomy, Classical transmitters in the CNS.* (Ed.) A. Bjorklund, T. Hokfelt, Amsterdam: Elsevier, **2**: 157-276.

Hoover, W.B. y Vertes, R.P. (2011). Projections of the medial orbital and ventral orbital cortex in the rat. *J. Comp Neurol.* **519**: 3766–3801

Howe, J.R., Sutor, B. y Zeiglgansberger, W. (1987). Baclofen reduces post-synaptic potentials of rat cortical neurones by an action other than its hyperpolarising action. *J. Physiol. (London)*, **384**: 539-569.

Hsu, K.S., Huang, C.C., Yang, C.H. y Gean, P.W. (1995). Presynaptic D2 dopaminergic receptors mediate inhibition of excitatory synaptic transmission in rat neostriatum. *Brain Res.*, **690**: 264–268.

Huang, P., Xuan, M., Gu, Q., Yu, X., Xu, X., Luo, W. y Zhang, M. (2015). Abnormal amygdala function in Parkinson's disease patients and its relationship to depression. *J. Affect Disord.*, **183**: 263-8.

Hulme, E.C., Birdsall, N.J.M. y Buckley N.J. (1990). Muscarinic Receptor Subtypes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **30**: 633-673.

Inagakis, S. y Parent, A. (1985). Distribution of enkephalin-immunoreactive neurons en the forebrain and upper brain stem of the squirrel monkey. *Brain Res.*, **359**: 267-280.

Janigro D. y Schwartzkroin, P.A. (1988). Effects of GABA and baclofen on pyramidal cells in the developing rabbit hippocampus: an 'in vitro' study. *Developmental Brain Research*. 41(1–2): 171–184.

Johnston, J.B. (1923). Further contribution to the study of evolution of the forebrain. *Journal of Comparative Neurology*. **35**: 337-481.

Jones E.G. y Powel T.P.S. (1970). Connexions of the somatic sensory cortex of the rhesus monkey. *Brain*, **93**: 37-56.

Kaada B.R. (1972). Stimulation and Regional Ablation of the Amygdaloid Complex with Reference to Functional Representations. *The Neurobiology of the Amygdala*, **2**: 205-281.

Kamal, A.M. y Tömböl, T. (1975). Golgi studies on the amygdaloid nuclei of the cat. *J. Hirnforsch.* **16**: 175–209.

Kamali, A., Yousem, D.M., Lin, D.D., Sair, H.I., Jasti, S.P., Keser, Z., Riascos, R.F. y Hasan, K.M. (2015). Mapping the trajectory of the stria terminalis of the human limbic system using high spatial resolution diffusion tensor tractography. *Neurosci Lett.*, **608**: 45-50.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Siegelbaum, S.A. y Hudspeth, A.J. (2013). Principles os Neuroscience. Quinta edición. McGraw-Hill Medical.

- Kanemoto, K., Kawasaki, J. y Kawai, I. (1996). Postictal psychosis: a comparison with acute interictal and chronic psychoses. *Epilepsia* **37**: 551-556.
- Kemppainen, S., Jolkkonen, E. y Pitkänen A. (2002). Projections from the posterior cortical nucleus of the amygdala to the hippocampal formation and parahippocampal region in rat. *Hippocampus*, 12(6) 735–755.
- Kesner, R.P. (1981). The role of the amygdala within an attribute analysis of memory. In Y. Ben-Ari (Ed.), *The amygdaloid complex*. Amsterdam: Elsevier.
- Kesner R.P. y Andrus, R.G. (1982). Amygdala stimulation disrupts the magnitude of reinforcement contribution to long-term memory. *Physiological Psychology*, 10(1): 55-59.
- Kesner, R.P. y Ardí, J.D. (1983). Long-term memory for contextual attributes: dissociation of amygdala and hippocampus. *Behavioural Brain Research*, 8(2): 139-149.
- Kesner, R.P. y Doty, R.W. (1968). Amnesia produced in cats by local seizure activity initiated from the amygdala. *Experimental Neurology*, 21(1): 58-68.
- Killcross, S., Robbins, T.W. y Everitt, B.J. (1997) Different types of fear-conditioned behavior mediated by separate nuclei within the amygdala. *Nature*, **388**: 377-380.
- Kimura, F. y Baughman, R.W. (1997). Distinct Muscarinic Receptor Subtypes Suppress Excitatory and Inhibitory Synaptic Responses in Cortical Neurons. *Journal of Neurophysiology*, 77(2): 709-716 .
- Kirkpatrick, B. y Buchanan, R.W. (1990). The neural basis of the deficit syndrome of schizophrenia. *J. Nerv. Ment. Dis.*, **178**: 545–555.
- Klingler, J. y Gloor, P. (1960). The connections of the amygdala and of the anterior temporal cortex in the human brain. *Journal of Comparative Neurology*, 115(3): 333–369.
- Kluver, H. y Bucy, P.C. (1937) “Psychic blindness” and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. *Am. J. Physiol.*, **119**: 352-353.
- Kromer Vogt, L.J., Hyman, B.T., Van Hoesen G.W. y Damasio, A.R. (1990). Pathological alterations in the amygdala in Alzheimer’s disease. *Neuroscience*, **37**: 377–385.

Lambert, N.A., Harrison, N.L., Kerr, D.I.B., ONG, J., Prager, R.H. y Teyler, T.J. (1989). Blockade of the late IPSP in rat CA1 hippocampal neurons by 2-hydroxy-saclofen. *Neurosci. Lett.*, **107**: 125-128.

Lawrie, S.M. y Abukmeil, S.S. (1998). Brain abnormality in schizophrenia. Asystematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies. *Br. J. Psychiatry*, **172**: 110-120.

LeDoux, J.E. (1992) Emotion and the amygdala. The Amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction (pp. 339-351), Aggleton, (Ed.), New York: Wiley-Liss.

LaBar, K.S. y LeDoux, J.E. (1996). Partial disruption of fear conditioning in rats with unilateral amygdala damage: correspondence with unilateral temporal lobectomy in humans. *Behav. Neurosci.*, 110(5):991-997.

Le Gal La Salle, G., and Y. Ben-Ari (1981) Unit activity in the amygdaloid complex: A review. En: *The Amygdaloid Complex*, (pp. 227-237). (Ed.), Y. Ben-Ari, Elsevier, Amsterdam.

Le Gal La Salle G. (1976). Unitary responses in the amygdaloid complex following stimulation of various diencephalic structures. *Brain Res.* 118(3):475-478.

Levin, E.D. (1992). Nicotinic systems and cognitive function. *Psychopharmacology* **108**: 417-431.

Liang, K.C., McGaugh, J.L., Martínez, Jr J.L., Jensen, R.A., Vasquez, B.J. y Messing R.B. (1982). Post-training amygdaloid lesions impair retention of an inhibitory avoidance response. *Behav. Brain Res.*, **4**: 237-249.

Liang, K.C., Messing, R.B. y Mcgaugh, J.L. (1983). Naloxone attenuates amnesia caused by amygdaloid stimulation: The involvement of a central opioid system. *Brain Res.*, 271(1):41-49.

Lidsky, T.I., Levine, M.S., Kreinick, C.J. y Schwartz-Baum, J. (1970). Retrograde effects of amygdaloid stimulation on conditioned suppression (CER) in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, **73**: 135-149.

- Lidsky, A. y Slotnick, B.M. (1971). Effects of posttrial limbic stimulation on retention of a one-trial passive avoidance response. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, **76**: 337-348.
- Ljüngdahl, A., Hökfelt, T. y Nilsson, G. (1978). Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. I. Cell bodies and nerve terminals, *Neuroscience*, **3**: 361-943.
- Maier, M., Mellers, J., Toone, B., Trimble, M. y Ron, M.A. (2000). Schizophrenia, temporal lobe epilepsy and psychosis: an in vivo magnetic resonance spectroscopy and imaging study of the hippocampus/amygdala complex. *Psychol Med.*, 30(3):571-581.
- Maren, S. y Fanselow M.S. (1996). The Amygdala and Fear Conditioning: Has the Nut Been Cracked?. *Neuron.*, 16(2): 237–240.
- Mascó, D.H. y Carrer, H.F. (1980). Sexual receptivity in female rats after lesión or stimulation in different amygdaloid nuclei. *Physiology and Behavior*, **24**: 1073-1080.
- Mash, D.C. y Potter, L.T. (1986). Autoradiographic localization of M1 and M2 muscarine receptors in the rat brain. *Neuroscience*, 19(2): 551-564.
- McCarren, M. y Alger, B.E. (1985). Use dependent depression of IPSPs in rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J. Neurophysiol.*, **53**: 557-571.
- McCormick, D.A. y Prince, D.A. (1986). Acetylcholine induces burst firing in thalamic reticular neurones by activating a K⁺ conductance. *Nature*, **319**: 147-165.
- McCormick, D.A. and Prince, D.A. (1987) Actions of acetylcholine in the Guinea Pig and Cat Lateral and Medial Geniculate Nuclei. *J. Physiol. (Lond)*, **392**: 147– 165.
- McDonald, A.J. y Culbertson, J.L. (1981). Neurons of the basolateral amygdala: a Golgi study in the opossum (*Didelphis virginiana*). *Am. J. Anat.*, **162**: 327–342.
- McDonald A.J. (1982). Neurons of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei: a Golgi study in the rat. *J. Comp Neurol.*, **212**: 293–312.
- McDonald, A.J. (1984). Neuronal organization of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **222**: 589–606.

McDonald, A.J. (1992a). Cell types and intrinsic connections of the amygdala. En: *The Amygdala* (pp. 67–96). (Ed.) J.P. Aggleton, Wiley-Liss; New York.

McDonald A.J. (1992b). Projection neurons of the basolateral amygdala: a correlative Golgi and retrograde tract tracing study. *Brain Res. Bull.*, **28**: 179–185.

McDonald, A.J. (1997). Calbindin-D28k immunoreactivity in the rat amygdala. *J. Comp. Neurol.*, **383**: 231–244.

McDonald, A.J. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress in Neurobiology*. **55**: 257-332.

McDonald, A.J. (2003). Is there an amygdala and how far does it extend?: an anatomical perspective. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **985**: 1-21.

McDonough, J.H., Jr., y Kesner, R.P. (1971). Amnesia produced by brief electrical stimulation of the amygdala or dorsal hippocampus in cats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, **77**: 171–178.

McGaugh, J.L. (1989). Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. *Annual Review of Neuroscience*, **12**: 255-287.

McGaugh J.L., Introini-Collison I.B., Cahill L., Kim M., Liang K.C. y Aggleton J.P. (1992). Involvement of the amygdala in neuromodulatory influences on memory storage. En: *The Amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction*, (Ed.) J.P. Aggleton, Wiley–Liss, New York.

Mehler, W.R. (1980), Subcortical afferent connections of the amygdala in the monkey. *J. Comp. Neurol.*, **190**: 733–762.

Mesulam, M.M., Mufson, E.J., Levey, A.I. y Wainer, B.H. (1983) Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata) and hypothalamus in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* **214**: 170–197.

Meibach, R.C. y Katzman, R. (1981). Origin, course and termination of dopaminergic substantia nigra neurons projecting to the amygdaloid complex in the cat. *Neuroscience*, **6**: 2159-2171.

Michael, R.P. y Rees, H.D. (1982). Autoradiographic localization of 3H dihydrotestosterone in the preoptic area, hypothalamus, and amygdala of a male rhesus monkey. *Life Sciences*, 30 (24):2087-93.

Michel, F.J., Robillard, J.M. y Trudeau LE. (2004). Regulation of rat mesencephalic GABAergic neurones through muscarinic receptors. *J. Physiol.* 556(2):429-45.

Millhouse, O.E. y De Olmos, J. (1983): Neuronal configuration in lateral and basolateral amygdala. *Neuroscience*, **10**: 1269-1300.

Miñano, F.J., Meneres, M.S., Sancibrian, M. y Salinas, P. (1992). GABA_A Receptors in the Amygdala: Role in Feeding in Fasted and Satiated Rats. *Brain Res.*, **586**: 104-110.

Mishkin, M. (1978). Memory in monkeys severely impaired by combined but not separate removal of amygdala and hippocampus. *Nature*, **273**: 297-99.

Mishkin, M., y Aggleton J. (1981). Multiple functional contributions of the amygdala in the monkey. En: *The Amygdaloid Complex* (pp. 409-420), (Ed.) Y. Ben-Ari, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

Moore, R.Y., Halaris, A.E. y Jones, B.E. (1978). Serotonin neurons of the midbrain raphe: ascending projections. *J. Comp. Neurol.*, **180**: 417–438.

Morgan, M.A. y LeDoux, J.E. (1999). Contribution of ventrolateral prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 72(3): 244-51.

Moyer, J.R., Ehlers, V.L., y Song, C. (2015). Trace fear conditioning differentially modulates intrinsic excitability of mPFC-BLA projection neurons in infralimbic and prelimbic cortices. *Journal of Neuroscience*, **35**: 13511-13524.

Muller, D., Joly, M. y Lynch, G. (1988). Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. *Science*, **242**: 1694–1697.

Murphy, J.T., Dreifuss, J.T., y Gloor, P. (1968). Topographical differences in the responses of Single hypothalamic neurons to limbic stimulation. *American Journal of Physiology*, **214**: 1443-1453.

Murria, E.A. y Mishkin, M. (1983). Severe tactual memory deficits in monkeys after combined removal of the amygdala and hippocampus. *Brain Res.*, 270(2): 340-344.

Nagai, T., Kimura, H., Maeda, T., McGeer, P.L., Peng, F. y McGeer, E.G. (1982) Cholinergic projections from the basal forebrain of rat to the amygdala. *J. Neurosci.*, **2**: 513-520.

Newton, F.H., Rosenberg, R.N., Lambert, P.W. y O'Brien, J.S. (1971). Neurologic involvement in Urbach-Wiethe's disease (lipoid proteinosis). A clinical, ultrastructural, and chemical study. *Neurology*, **21**: 1205-1213.

Nicoll, R.A. y Alger B.E. (1981) A simple chamber for recording from submerged brain slices. *J. Neurosci. Methods*, **4**: 153-156.

Nieuwenhuys, R., Voogd, J. y Van Huijzen, C. (2009). El Sistema Nervioso Central Humano. 4ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid.

Nitecka, L., and Frotscher, M. (1989). Organization and synaptic interconnections of GABAergic and cholinergic elements in the rat amygdaloid nuclei: Single and double immunolabeling studies. *J. Comp. Neurol.* **279**: 470–488.

Niu, J.G., Yokota, S., Tsumori, T., Oka, T. y Yasui, Y. (2012). Projections from the anterior basomedial and anterior cortical amygdaloid nuclei to melanin-concentrating hormone-containing neurons in the lateral hypothalamus of the rat. *Brain Res.*, **1479**: 31-43.

Norgren, R. (1976). Taste pathways to hypothalamus and amygdala. *J. Comp. Neurol.*, 166(1):17-30.

Ohno, M., Yamamoto, T. y Watanabe, S. (1992). Intrahippocampal injections of benzodiazepine and muscimol impair working memory but not reference memory of rats in the three-panel runway task. *Eur. J. Pharmacol.*, 219(2): 245–251.

Ottersen, O.P. (1981). The afferent connections of the amygdala of the rat as studied with retrograde transport of horseradish peroxidase. En: *The Amygdaloid Complex* (pp. 91-104). (Ed.) Y. Ben-Ari Elsevier/North-Holland, Amsterdam,

Ottersen, O.P. y Storm-Mathisen, J. (1984). Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique, *Journal of Comparative Neurology*, 229(3): 374-392.

Ottersen, O.P., Davanger, S. y Storm-Mathisen, J. (1987). Glycine-like immunoreactivity in the cerebellum of rat and Senegalese baboon, *Papio papio*: a comparison with the distribution of GABA-like immunoreactivity and with [3H]glycine and [3H]GABA uptake. *Exp. Brain Res.*, 66(1): 211-21.

Paré, D., Smith, Y. y Paré, J.F. (1995). Intra-amygdaloid projections of the basolateral and basomedial nuclei in the cat: Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin anterograde tracing at the light and electron microscopic level. *Neuroscience.*, 69(2): 567-583.

Paré, D. y Gaudreau, H. (1996). Projection cells and interneurons of the lateral and basolateral amygdala: distinct firing patterns and differential relation to theta and delta rhythms in conscious cats. *J. Neurosci.*, 16(10): 3334-3350.

Parent A. (1981). Comparative anatomy of the serotonergic systems. *J. Physiol. (Paris)*. 77(2-3): 147-56.

Paxinos, G. y Watson, C. (1982). *The Rat Brain in Stereotactic Coordinates*. Academic Press, New York.

Pfaff, D.W., Gerlach, J.L., McEwen, B.S., Ferin, M., Carmel, P. y Zimmerman, E.A. (1976). Autoradiographic localization of hormone-concentrating cells in the brain of the female rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 170(3): 279-93.

Phelan, K.D. y Gallagher, J.P. (1992). Direct muscarinic and nicotinic receptor-mediated excitation of rat medial vestibular nucleus neurons in vitro. *Synapse*, 10(4): 349-358.

Phelps, E.A. (2004). Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(2): 198–202.

Pellegrino, L.J. (1965) The effects of amygdaloid stimulation on passive avoidance. *Psychon. Sci.*, 2: 189–190.

Pellegrino, L.J. (1968). Amygdaloid lesions and behavioral inhibition in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 65: 483–491.

Penfield, W. y B. Milner (1958). Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. *Arch. Neurol. Psychiatry*, **79**: 475-497.

Mullan, S. y Penfield, W. (1959). Illusions of comparative interpretation and emotion; production by epileptic discharge and by electrical stimulation in the temporal cortex. *AMA. Arch Neurol Psychiatry*, 81(3): 269-284.

Palkovits, M., Saavedra, J.M., Kobayashi, R.M. y Brownstein M. (1974). Choline acetyltransferase content of limbic nuclei of the rat. *Brain Res.*, 79(3): 443-50.

Peters, A. (1984b). Cerebral Cortex (pp. 361–380), E.G. Jones (Ed.), Plenum Press, London.

Pitkänen, A., Stefanacci, L., Farb, C.R, Go, G.G. y Amaral, D.G. (1995). Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the lateral nucleus. *J. Comp. Neurol.*, 356(2): 288-310.

Pitkänen, A., Tuunanen, J., Älviäinen, R.K. (1998). Amygdala damage in experimental and human epilepsy. *Epilepsy Res.*, **328**: 233–253.

Pitkänen, A. y Amaral, D.G. (1998). Organization of the intrinsic connections of the monkey amygdaloid complex: projections originating in the lateral nucleus. *J. Comp. Neurol.*, 398(3): 431-58.

Pitkänen, A., Pikkarainen, M., Nurminen, N. y Ylinen, A. (2000). Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. (A review). *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **911**: 369-91.

Pitler, T.A. y Alger, B.E. (1992). Cholinergic excitation of GABAergic interneurons in the rat hippocampal slice. *J. Physiol.*, **450**: 127-42.

Post, S. y Mai, J.K. (1980). Contribution to the amygdaloid projection field in the rat. A quantitative autoradiographic study. *J. Hirnforsch.*, 21(2): 199-225.

Prelević, S., Burnham, W.M. y Gloor, P. (1976). A microelectrode study of amygdaloid afferents: temporal neocortical inputs. *Brain Res.*, 105(3): 437-457.

- Price, J. (1981). Connectivity of the rat amygdaloid complex. En: *The Amygdaloid Complex, INSERM Symposium*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, **20**: 13-18.
- Price, J.L., Russchen, F.T. y Amaral, D.G. (1987). The limbic region. II: the amygdaloid complex. (Ed.) Björklund A, Hökfelt T, Swanson LW, *Handbook of chemical neuroanatomy*. Elsevier, Amsterdam, **5**: 279–388.
- Quirk, G.J., Armony J.L. y LeDoux, J.E. (1997). Fear Conditioning Enhances Different Temporal Components of Tone-Evoked Spike Trains in Auditory Cortex and Lateral Amygdala. *Neuron*, **19**: 613–624.
- Quirk, G.J. y Gehlert, D.R. (2003). Inhibition of the amygdala: key to pathological states?. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **985**: 263-272.
- Ragsdale, C.W. y Graybiel, A.M. (1988). Fibers from the basolateral amygdala selectively innervate the striosomes in the caudate nucleus of the cat. *J. Comp. Neurol.* **269**: 506–522.
- Rainnie, D.G., Asprodini, E.K., Shinnick-Gallagher, P. (1991a). Excitatory transmission in the basolateral amygdala. *J. Neurophysiol.*, **66**(3): 986-98.
- Rainnie, D.G., Asprodini, E.K., Shinnick-Gallagher, P. (1991b). Inhibitory transmission in the basolateral amygdala. *J. Neurophysiol.*, **66**(3):999-1009.
- Rainnie, D.G., Asprodini, E.K. y Shinnick-Gallagher, P. (1993). Intracellular recordings from morphologically identified neurons of the basolateral amygdala. *J. Neurophysiol.*, **69**(4): 1350-1362.
- Reppucci, C.J. y Petrovich, G.D. (2015). Organization of connections between the amygdala, medial prefrontal cortex, and lateral hypothalamus: a single and double retrograde tracing study in rats. *Brain Struct. Funct.*, (pp 1-26).
- Richardson, J. S. (1973). The amygdala: Historical and functional analysis. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, **33**: 623–644.
- Rizvi, T.A., Ennis, M., Behbehani, M.M. y Shipley, M.T. (1991). Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. *J. Comp. Neurol.*, **303**(1): 121-31.

Roberts, G. (1992). Neuropeptides: cellular morphology, major pathways and functional considerations. En *The Amygdala: Neurobiological aspect of emotion, Memory and mental Dysfunction* (pp. 115-142). Aggleton, J (Ed.), Wiley-Liss INC., New York.

Rosenkranz, J.A. y Grace, A.A. (2001). Dopamine attenuates prefrontal cortical suppression of sensory inputs to the basolateral amygdala of rats. *J. Neurosci.*, **21**: 4090–4103.

Rosin, D.L., Clark, W.A., Goldstein, M., Roth, R.H. y Deutch, A.Y. (1992). Effects of 6-hydroxydopamine lesions of the prefrontal cortex on tyrosine hydroxylase activity in mesolimbic and nigrostriatal dopamine systems. *Neuroscience*, 4(4): 831-839.

Równiak, M., Szteyn, S. y Robak A. (2003). A comparative study of the mammalian amígdala: a Golgi study of the basolateral amygdala. *Folia Morphol.*, 62(4): 331-339.

Russchen, F.T., Bakst, I., Amaral, D.G. y Price J.L. (1985). The amygdalostriatal projections in the monkey. An anterograde tracing study. *Brain Res.*, 329(1-2): 241-57.

Sadikot, A.F., Smith, V. y Parent, A. (1988). Chemical anatomy of the amygdala in primate. *Soc. Neurosci. Abstr.* **14**:860.

Sadikot, A.F. y Parent, A. (1990). The monoaminergic innervation of the amygdala in the squirrel monkey: An Immunohistochemical study. *Neuroscience.*, **36**: 431-447.

Sah, P. y Lopez de Armentia, M. (2003). Excitatory synaptic transmission in the lateral and central amygdala. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **985**: 67-77.

Sakanaka, M., Shiosaka, S., Takatsuki, K., Inagaki, S., Takagi, H., Senba, E., Kawai, Y., Matsuzaki, T. y Tohyama, M. (1981). Experimental immunohistochemical studies on the amygdalofugal peptidergic (substance P and somatostatin) fibers in the stria terminalis of the rat. *Brain Res.*, 221(2): 231-42.

Savander, V., Go, C.G., LeDoux, J.E. y Pitkänen, A. (1995). Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the basal nucleus. *J. Comp. Neurol.*, 361(2): 345-68.

Scoville, W.B. (1954). The limbic lobe in man. *J. Neurosurg.*, 11(1): 64-66.

Scoville, W.B. y Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 20(1): 11-21.

Segal, M. (1982). Multiple action of acetylcholine at a muscarinic receptor studied in the rat hippocampal slice. *Brain Res.*, 246(1): 77-87.

Sanghera, M.K., Rolls, E.T., Roper-Hall, A. (1979). Visual responses of neurons in the dorsolateral amygdala of the alert monkey. *Exp. Neurol.*, 63(3): 610-26.

Scalia, F., Winans, S.S. (1975). The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J. Comp. Neurol.*, 161(1): 31-55.

Shealy, C.N. y Peele, T.L. (1957). Studies of amygdaloid nucleus of cat. *J Neurophysiol*, 20(2): 125-139.

Sheridan, R.D. y Sutor, B. (1990). Presynaptic M1 muscarinic cholinergic receptors mediate inhibition of excitatory synaptic transmission in the hippocampus in vitro. *Neurosci Lett.*, 108(3): 273-278.

Siebert, M., Markowitsch, H.J. y Bartel, P. (2003). Amygdala, affect and cognition: evidence from 10 patients with Urbach±Wiethe disease. *Brain*, **126**: 1-11.

Skår, J. y Ursin, H. (1978). Exploration and avoidance in rats with lesions in amygdala and piriform cortex. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 92(4): 672-81.

Slater, E., Beard, A.W. y Glithero E. (1963). The schizophrenia-like psychosis of epilepsy. *Br. J. Psychiatry*, **109**: 95-150.

Sofroniew MV. (1985). Vasopressin- and neurophysin-immunoreactive neurons in the septal region, medial amygdala and locus coeruleus in colchicine-treated rats. *Neuroscience.*, 15(2): 347-58.

Soltész, I., Lightowler, S., Leresche, N. y Crunelli, V. (1989). On the properties and origin of the GABA_B inhibitory postsynaptic potential recorded in morphologically identified projection cells of the cat dorsal lateral geniculate nucleus. *Neuroscience*, **33**: 23-33.

Song, C., Ehlers, V.L. y Moyer, J.R. Jr. (2015). Trace Fear Conditioning Differentially Modulates Intrinsic Excitability of Medial Prefrontal Cortex-Basolateral Complex of

Amygdala Projection Neurons in Infralimbic and Prelimbic Cortices. *J. Neurosci.*, 5(39): 13511-13524.

Stacey, N.E. y Kyle, A.L. (1983). Effects of Olfactory Tract Lesions on Sexual and Feeding Behavior in the Goldfish. *Physiology & Behavior*, **30**: 621-628.

Staut, C.C.V. y Naidich TP. (1998). Urbach-Wiethe disease (lipoid proteinosis). *Pediatr. Neurosurg.*, **28**: 212-214.

Stefanacci, L., Farb, C.R., Pitkänen, A., Go. G., LeDoux, J.E. y Amaral, D.G. (1992). Projections from the lateral nucleus to the basal nucleus of the amygdala: a light and electron microscopic PHA-L study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 323(4): 586-601.

Stevens, D.R., Gallagher, J.P., y Shinnick-Gallagher, P. (1987). In vitro studies of the role of γ -aminobutyric acid in inhibition in the lateral septum of the rat. *Synapse*, 1(2): 184-190.

Sugita, S., Uchimura, N., Jiang, Z.G. y North, R.A. (1991). Distinct muscarinic receptors inhibit release of gamma-aminobutyric acid and excitatory amino acids in mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88(6): 2608-11.

Sugita, S., Tanaka, E. y North, R.A. (1993). Membrane properties and synaptic potentials of three types of neurone in rat lateral amygdala. *J. Physiol. (London)*, 460(1): 705-718.

Swanson, L.W. (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res. Bull.*, 9(1-6): 321-353.

Swanson L.W. y Petrovich, G.D. (1998) What is The Amygdala?. *Trends in Neuroscience*, 21(8): 323-330.

Szerb, J.C., Clow, K. y Rasmusson, D.D. (1994). Pharmacological but not physiological modulation of cortical acetylcholine release by cholinergic mechanisms in the nucleus basalis magnocellularis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 72(8): 893-8.

Takagi, M. y Yamamoto, C. (1981). The long-lasting inhibition recorded in vitro from the lateral nucleus of the amygdala. *Brain Res.*, 206(2):474-8.

Tessitore, A., Hariri, A.R., Fera, F., Smith, W.G., Chase, T.N., Hyde, T.M., Weinberger, D.R. y Mattay, F. (2002). Dopamine Modulates the Response of the Human Amygdala: A Study in Parkinson's Disease. *J. Neurosci.*, 22(20): 9099-9103.

Thompson, C.I. (1981). Long-term behavioral development of rhesus monkeys after amygdectomy in infancy. En: *The Amygdaloid Complex* (pp. 259–270), (Ed.) Y. Ben-Ari, Amsterdam: Elsevier.

Torras, M., Portell, I. y Morgado, I. (2001). The amigdaloid body: functional implications. *Rev. Neurol.*, 33(5): 471-476.

Tosevski, J. Aleksandar Malikovic A., Mojsilovic-Petrovic J., Lackovic V, Peulic M., Sazdanovic, P. y Alexopoulos C. (2002). Types of neurons and some dendritic patterns of basolateral amygdala in humans -a Golgi study. *Annals of Anatomy- Anatomischer Anzeiger*, 184(1): 93–103.

Traub, R.D., Miles, R. y Wong, R.K.S. (1987). Models of synchronized hippocampal bursts in the presence on inhibition. I. Single population events. *J. Neurophysiol.*, **58**: 739-764.

Trimble, M.R. (1991). *The psychoses of epilepsy*. New York: Raven Press.

Turner, D.A. (1990). Feed-forward inhibitory potentials and excitatory interactions in guinea-pig hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol. (London)*, **422**: 333-350.

Tseng, G.F. y Haberly, L.B. (1988). Characterisation of synaptically mediated fast and slow inhibitory processes in piriform cortex in an in vitro slice preparation. *J. Neurophysiol.*, **59**: 1352-1376.

Underwood, B. J. (1969). Attributes of Memory. *Psychological Review*, 76: 559-573.

Ursin, H. (1965). Effect of amygdaloid lesions on avoidance and visual discrimination in cats. *Experimental Neurology*, 11(3): 298-317.

Van der Zee, E.A., Roozendaal, B., Bohus, B., Koolhaas, J.M. y Luiten, P.G. (1997). *Neuroscience*, 76(1): 63-73.

Van Hoesen, G.W. (1981). The differential distribution, diversity and sprouting of cortical projections to the amygdala in the rhesus monkey. En: *The Amygdaloid Complex* (pp. 77–90), (Ed.) Ben-Ari, Y. Elsevier/North-Holland, New York.

Van Mierlo, T.J., Chung, C., Foncke, E.M., Berendse, H.W. y Van den Heuvel, O.A. (2015). Depressive symptoms in Parkinson's disease are related to decreased hippocampus and amygdala volume. *Mov. Disord.*, 30(2): 245-52.

Velasco, M. y Taleisnik, S. (1971). Effect of the interruption of amygdaloid and hippocampal afferents to the medial hypothalamus on gonadotropin release. *J. Endocrinol.*, 51: 41-55.

Veer, I.M., Oei, N.Y., Van Buchem, M.A., Spinhoven, P., Elzinga, B.M. y Rombouts, S.A. (2015). Evidence for smaller right amygdala volumes in posttraumatic stress disorder following childhood trauma. *Psychiatry Res.*, 233(3): 436-42.

Vertes, R.P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*, 51(1): 32-58.

Wasburn, M.S. y Moises, H. (1992). Muscarinic responses of rat basolateral amygdaloid neurons recorded in vitro. *J. Physiol. (London)*, 449(1): 121–154.

Wasburn, M.S. y Moises, H. (1992). Inhibitory responses of rat basolateral amygdaloid neurons recorded in vitro. *Neuroscience*, 50(4): 811-30.

Watanabe, Y. y Weiland NG, y McEwen, B.S. (1995). Effects of adrenal steroid manipulations and repeated restraint stress on dynorphin mRNA levels and excitatory amino acid receptor binding in hippocampus. *Brain Res.*, 680(1–2): 217–225.

Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T. y Hayasaki, H. (2002). GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int. Rev. Cytol.*, 213: 1–47.

Whitelaw, R.B., Markou, A., Robbins, T.W. y Everitt, B.J. (1996). Excitotoxic lesions of the basolateral amygdala impair the acquisition of cocaine-seeking behaviour under a second-order schedule of reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)*, 127(3): 213-24.

Woolf, N.J., y Butcher, L.L. (1982). Cholinergic projections to the basolateral amygdala: A combined Evans Blue and acetylcholinesterase analysis. *Brain Res. Bull.*, 8: 751–763.

Womble, M.D, y Moises, H.C. (1992). Muscarinic inhibition of M-current and a potassium leak conductance in neurones of the rat basolateral amygdala. *J. Physiol.* **457**: 93-114.

Womble, M.D, y Moises, H.C. (1993). Muscarinic modulation of conductances underlying the afterhyperpolarization in neurons of the rat basolateral amygdala. *Brain Res.*, 621(1): 87-96.

Wright, I.C., Rabe-Hesketh, S., Woodruff, P.W.R., David, A.S., Murray, R.M. y Bullmore, E.T. (2000). Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, **157**: 16–25.

Wright, C.I., Dickerson, B.C., Feczko, E., Negeira, A. y Williams, D. (2007). A functional magnetic resonance imaging study of amygdala responses to human faces in aging and mild Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry*, **62**: 1388–1395.

Yajeya, J., Patino, A., Riobos, A.S., Criado, J.M. y de la Fuente, A. (1991). Passive avoidance conditioning and unitary activity in the basolateral amygdaloid nucleus of the rat. *Acta. Physiol. Scand.*, 141(4): 549-53.

Yajeya, J., de la Fuente, A., Merchán, M.A., Riobos, A.S., Heredia, M. y Criado, J.M. (1997). Cholinergic responses of morphologically and electrophysiologically characterized neurons of the basolateral complex in rat amygdala slices. *Neuroscience*, 78(3): 731-43.

Yajeya, J., Fuente, A., Bajo, V.M., Riobos, A.S., Heredia, M. y Criado, J.M. (1999). Muscarinic activation of a nonselective cationic conductance in pyramidal neurons in the rat basolateral amygdala. *Neuroscience*, **88**: 159-167

Yajeya, J., de la Fuente, A., Criado J.M., Bajo, V.M., Riobos, A.S. y Heredia, M. (2000). Muscarinic agonist depresses excitatory synaptic transmission in the rat basolateral amygdala in vitro. *Synapse*, **38**: 151-160.

Yilmazer-Hanke, D., O'Loughlin, E. y McDermott, K. (2015). Contribution of amygdala pathology to comorbid emotional disturbances in temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Res.* n/a-n/a. Online publication date: 1-Nov-2015.

Záborszky, L., Brownstein, M.J. y Palkovits, M. (1977). Ascending projections to the hypothalamus and limbic nuclei from the dorsolateral pontine tegmentum: a biochemical and electron microscopic study. *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.* 25(2-3): 175-88.

Zola-Morgan, S., Squire, L.R. y Mishkin, M. (1982). The neuroanatomy of amnesia: amygdala-hippocampus versus temporal stem. *Science*, 218(4579): 1337-9.

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

8.- ABREVIATURAS

AChE:	Acetilcolinesterasa
AP5:	Ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico
BLA:	Núcleo basolateral amigdalino
CE:	Cápsula externa
ChAT:	Colina acetiltransferasa
CNQX:	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
DC:	Corriente continua
EPSP:	Potencial excitatorio postsináptico
GABA :	Ácido γ -amino butírico
GAD:	Enzima glutamato descarboxilasa
IPSP:	Potencial inhibitorio postsináptico
LA:	Núcleo lateral amigdalino
NMDA:	N-metil-D-aspartato
RMP:	Potencial de reposo de la membrana
SNC:	Sistema Nervioso Central
SNP:	Sistema nervioso Periférico
ST:	Estría terminal
4-DAMP:	4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidine methiodide