

Aminoácidos extracelulares en la amígdala y el núcleo *accumbens* en la rata durante el dolor agudo.

Elizabeth Silva y Luis Hernández.

Laboratorio de Fisiología de la Conducta y Departamento de Fisiología.
Escuela de Medicina, Universidad de Los Andes (ULA). Mérida, Venezuela.
Correo electrónico: rosas@ula.ve.

Palabras clave: Núcleo *accumbens*, amígdala, test de la formalina, aminoácidos, microdiálisis, electroforesis capilar.

Resumen. En este trabajo se estudió la concentración extracelular de arginina, glutamato y aspartato en el núcleo basolateral de la amígdala y en la parte central del núcleo *accumbens*, durante la fase I del test de la formalina. Para ello se usó la técnica combinada de microdiálisis cerebral con electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por láser, en ratas que se movían libremente. Después de la inyección de la formalina, el glutamato y la arginina aumentaron significativamente en la parte central del núcleo *accumbens*; en el núcleo basolateral de la amígdala, el glutamato, la arginina y el aspartato, aumentaron significativamente. Estos hallazgos sugieren que ocurren cambios neuroquímicos rápidos en estas zonas después de la inyección de formalina, cambios que pudieran estar relacionados con la inmovilidad y los estados emocionales como la ansiedad, la aversión y/o depresión causados por el dolor.

Extracellular aminoacids in the amygdala and nucleus *accumbens* in the rat during acute pain.

Invest Clin 2007; 48(2): 213 - 224

Key words: Nucleus *accumbens*, amygdala, formalin test, amino acids, microdialysis, capillary electrophoresis.

Abstract. In the present experiments extracellular arginine, glutamate and aspartate were studied in the basolateral nucleus of the amygdala and core of the nucleus *accumbens* during the formalin test (phase I). A combination of capillary zone electrophoresis with laser induced fluorescence detection and microdialysis in freely moving rats was used. Glutamate and arginine

significantly increased in the nucleus *accumbens* after formalin injection; glutamate, arginine and aspartate significantly increased in the basolateral nucleus of the amygdala, after formalin injection. These experiments suggest that rapid neurotransmitters changes observed in the nucleus *accumbens* and amygdala, are possibly related to immobility and emotional states such as anxiety, aversion and/or depression caused by pain.

Recibido: 28-03-2006. Aceptado: 27-07-2006.

INTRODUCCIÓN

Las microinyecciones de morfina en el núcleo *accumbens* (Nac) producen analgesia profunda (1, 2). Efectos similares se observan cuando se inyecta morfina en la amígdala o la sustancia gris periacueductal (PAG), que son regiones conectadas al Nac (3, 4). Las microinyecciones de morfina en el Nac aumentan la liberación de encefalinas y beta endorfinas en la PAG y en la amígdala. El aumento de los opioides endógenos que se produce al hacer microinyecciones de morfina en el Nac se bloquea mediante la administración, en la PAG, de naloxona y/o anticuerpos contra la met-enkefalina (5). La activación simultánea de los receptores opioides μ y δ produce analgesia y los receptores kapa parecen tener un rol anti analgésico en el Nac (6). La morfina induce un incremento en el recambio de dopamina en el sistema límbico (Nac incluido) y éste incremento es inhibido significativamente por el tratamiento con formalina. Esta inhibición, a su vez, es suprimida por el pretratamiento con nor-binaltorfimina (nor-BNI, antagonista de los receptores kapa opioide) (7). Las sustancias (+)TANG67 y (-) TANG67, que actúan sobre los receptores opioides δ en el Nac pueden generar radicales libres que a su vez liberan glutamato que actúa sobre los receptores NMDA y promueve la liberación de dopamina del Nac (8). La inyección intracerebro-ventricular de glutamato aumenta la descarga de neuronas excitadas por el dolor en el Nac y esta acción es bloqueada por la

inyección del antagonista MK-801, lo que involucra los receptores NMDA y el glutamato en la modulación de la información nociceptiva en el Nac (9). Otro trabajo sugiere que la analgesia que produce la inyección de morfina en el Nac parece estar mediada por la supresión de la actividad inhibitoria de las neuronas gabaérgicas que se localizan en este núcleo (10). En animales que reciben formalina, la inyección de bupacaína en la parte central del Nac produce analgesia, en cambio la misma inyección en la parte periférica no altera el test de dolor (11).

La participación de la amígdala en la modulación del dolor y la analgesia se sugiere a partir del hallazgo en el cual, al inyectar la morfina *in situ*, como al aplicar agonistas μ y al estimular eléctricamente la amígdala se produce un aumento del umbral al dolor. La naltrexona en la PAG, la naloxona *in situ*, y/o la destrucción de la amígdala producen una atenuación de la analgesia por acupuntura o por morfina (12-17). La amígdala y el hipotálamo pudieran estar envueltos en las reacciones motivacionales y la adaptación neuroendocrina que ocurre en el organismo ante un estímulo nocivo (18). Hay un sustrato morfológico de la vía analgésica, desde los núcleos del rafe dorsal hacia la amígdala (19). Estudios de conducta y de microdiálisis muestran que el dolor sostenido producido por la inyección de formalina intraplantar induce aversión condicionada a través del aumento de la liberación de glutamato y de la activación de los receptores NMDA en la amígdala

basolateral. La inyección de morfina en este núcleo suprime la liberación de glutamato y dicha aversión (20). En la amígdala, el estrés persistente aumenta el marcaje para la quinasa proteica C mediada por los receptores NMDA (21).

La acción del aminoácido excitador glutamato en el cerebro parece ser compleja, ya que la activación de estos receptores en algunas áreas como el tálamo y los núcleos sensoriales trigeminales parece ser pro-nociceptiva (22, 23), en cambio en otras zonas como la PAG y bulbo raquídeo ventrolateral parece ser antinociceptiva (24, 25).

El óxido nítrico (NO) es un gas neuro-modulador sintetizado a partir de la L-arginina por acción de la enzima NO sintetasa (NOS). El NO ha sido implicado en el dolor, ya que los inhibidores de la NOS atenúan la hiperalgesia térmica (26). Se sabe que el exceso de activación del receptor NMDA aumenta el calcio citoplasmático y contribuye a la neurotoxicidad del glutamato (27). Se ha demostrado que la aplicación de NMDA durante 5 minutos, en ausencia de L-arginina, induce la muerte neuronal, y la presencia de L-arginina durante la aplicación de NMDA previene la pérdida neuronal por bloqueo de la formación de peroxinitrito y superóxido. Así, la L-arginina parece ser un importante modulador de la excitotoxicidad debida al glutamato. La L-arginina derivada de la glía inhibe la formación de radicales tóxicos inducida por NMDA, la disfunción mitocondrial y la muerte celular (28).

El propósito del presente trabajo fue investigar como cambia el contenido extracelular de los aminoácidos glutamato, aspartato y arginina en el núcleo basolateral de la amígdala y el Nac, durante la fase I del test de la formalina (0-10 min) usando las técnicas combinadas de microdiálisis y electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por láser (CZE-LIFD), en ratas que se mueven libremente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 24 ratas Wistar machos de peso corporal comprendido entre 250 y 300 g. Para la cirugía, fueron anestesiadas con Pentobarbital y colocadas en un instrumento estereotáxico. El procedimiento quirúrgico está bien descrito en trabajos previos (29, 30). Brevemente, se implantó en el lado izquierdo del cerebro una cánula guía de 10 mm hecha de tubo de acero inoxidable de 21 gauge, de acuerdo a las siguientes coordenadas: a) para la parte central del núcleo *accumbens*: 1 mm lateral a la sutura sagital; 2,2 mm anterior al bregma y 2,6 mm ventral a la superficie craneal; b) para el núcleo basolateral de la amígdala: 5 mm lateral a la sutura sagital; 2,8 mm posterior al bregma y 4,5 mm ventral a la superficie craneal (31). La cánula guía se cementó a la superficie del cráneo con tornillos de cabeza con huecos hexagonales y acrílico dental. Después de 7 días de recuperación las ratas estuvieron listas para la microdiálisis.

Procedimiento de microdiálisis

Las cánulas se fabricaron a partir de una pieza de fibra hueca de celulosa (200 μm de diámetro externo, con perforaciones que no permiten el paso de moléculas cuyo peso molecular sea superior a 13.000 Daltons), fijada con epoxi al extremo de un tubo de acero inoxidable. En el interior de ambos se colocó un capilar de sílica fundida, cubierta de poliimida, de 10 cm de largo, 76 μm de diámetro interno, y 150 μm de diámetro externo. La cánula de diálisis sobresalía 5 mm del final de la cánula guía, pero la longitud efectiva de la zona de ultrafiltración era de 2 mm (31). La entrada de la cánula estaba unida a un tubo de polietileno que se conectó a una jeringa llena de líquido céfaloraquídeo artificial (NaCl 134,9 mM; KCl 3,7 mM; CaCl₂ 1,2 mM; MgCl₂ 1 mM y NaHCO₃ 10 mM, a un pH de

7,4) colocada en una bomba que perfundió a un flujo de $1\mu\text{L}/\text{min}$. El día anterior al experimento se les insertó a las ratas la cánula de microdiálisis con un flujo a $0,4\mu\text{L}/\text{min}$. Se dejaron toda la noche y al día siguiente se cambió el flujo a $1\mu\text{L}/\text{min}$ y se esperó 1 hora. Después se tomaron 10 muestras basales en microtubos y se realizó el experimento que consistió en inyectar $50\mu\text{L}$ de formalina diluida (5%) en la pata derecha de la rata. Se siguió recolectando las muestras durante 10 min más. Las muestras se recolectaron cada 30 seg. En los controles, la inyección en la pata fue de $50\mu\text{L}$ de solución salina. En total 12 ratas con cánulas en el Nac fueron divididas en dos grupos de 6 cada uno (experimental: formalina y control: salina) y 12 ratas con cánulas en el núcleo basolateral de la amígdala fueron divididas de igual manera en dos grupos de 6 ratas cada uno (experimental: formalina y control: salina). Luego se derivatizó cada muestra siguiendo el protocolo descrito abajo. Se dejaron 18 horas en la oscuridad. Luego se analizaron en el instrumento de electroforesis capilar.

Después de los experimentos los animales fueron anestesiados profundamente, perfundidos trans cardíacamente con una solución de suero fisiológico seguida de formol (5%) y se disecaron los cerebros dejándolos en solución de formol (10%) para fijarlos, durante 2 días. Luego se hicieron cortes de $40\mu\text{m}$ de grosor con un micrótopo de congelación; los cortes no teñidos se observaron en un microscopio del luz para localizar la posición de las cánulas guías.

Procedimiento de derivatización

Las muestras fueron mezcladas con $0,5\mu\text{L}$ de la solución derivatizante hecha de solución de carbonato 20mM a un pH de 9,5 y una solución $2,5 \times 10^{-5}\text{M}$ del isómero I de isotiocianato de fluoresceína (FITC) en acetona en una proporción de 1:1 (vol:vol). Seguidamente la mezcla se centrifugó y se

dejó en un sitio oscuro por lo menos durante 18 horas para permitir la reacción de los aminoácidos con el FITC. Posteriormente cada vial que contenía una muestra fue diluido con $5\mu\text{L}$ de agua desionizada y centrifugado. Los estándares de arginina, glutamato, y aspartato fueron derivatizados con el mismo protocolo.

Procedimiento de medición en el instrumento de electroforesis capilar

La detección de arginina, glutamato, y aspartato fue realizada utilizando el instrumento R2D2-1 CZE-LIFD (Meridialysis®, Mérida, Venezuela) el cual está equipado con un capilar de sílica fundida de 40 cm de longitud, $350\mu\text{m}$ de diámetro externo y $25\mu\text{m}$ de diámetro interno. Las muestras y los estándares de aspartato y glutamato fueron inyectados hidrodinámicamente en el extremo anódico del capilar por efecto de una presión negativa de 19 psi aplicada durante 200 ms en el extremo catódico del capilar. Luego fueron aplicados 21 kV entre los dos extremos del capilar. El voltaje generó una corriente de $7\mu\text{A}$. Después de correr la muestra, el capilar fue lavado con NaOH 1M por 2 min, luego con agua de 18M durante 1 min y por último con una solución de carbonato por 2 min. Cada corrida completa demoró 15 min, más los tiempos de lavado.

En el electroferograma de cada muestra fueron identificados los aminoácidos (arginina, glutamato y aspartato) por el tiempo de migración y por la altura de la espiga. La presencia de estos aminoácidos fue comprobada de la siguiente manera: después de haber leído la muestra se combinó con una cantidad conocida de estándar de los aminoácidos respectivos y luego se volvió a medir para verificar que el pico de mayor magnitud era el que correspondía al aminoácido del estándar. Una vez corridas todas las muestras por electroforesis capilar se determinó la altura de los picos y se cal-

culó la concentración por comparación con las soluciones estándar.

Análisis estadístico

Se calculó para cada rata el promedio de la concentración basal sobre nueve muestras basales (previas al experimento). Los datos normalizados fueron analizados usando el ANOVA de una vía, el ANOVA de medidas repetidas y el post test Newman-Keuls. El nivel de significación estadística fue de $p < 0,05$ (programas estadísticos SPSS 8.0 y del GraphPad Prism para Windows).

RESULTADOS

Experimentos conductuales

El test de la formalina se usa como modelo de dolor animal. La inyección de formalina produce una respuesta bifásica: a) Fase 1, que dura de 7 a 10 min y b) Fase 2, que dura entre 45 min a 1 hora (32). Se decidió estudiar solo la fase 1, basándonos en estudios previos, en los que la liberación de glutamato es mayor en la fase 1 que en la fase 2 (23).

Se estudió la conducta de contracción de la pata minuto a minuto en los primeros 10 minutos después de la inyección de formalina, en ratas no operadas y operadas para la microdiálisis. Se observó que en ambos casos la respuesta fue similar y hubo mayor frecuencia de contracciones en los primeros minutos; después la respuesta fue disminuyendo hasta hacerse muy escasa los últimos minutos. A su vez, en el minuto 1 y 2 se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con el test ANOVA de medidas repetidas seguidos de post test de contraste entre los dos grupos. (Fig. 1).

Nucleus accumbens

Arginina: La concentración basal de arginina fue $0,62 \pm 0,06 \mu\text{M}$. La arginina

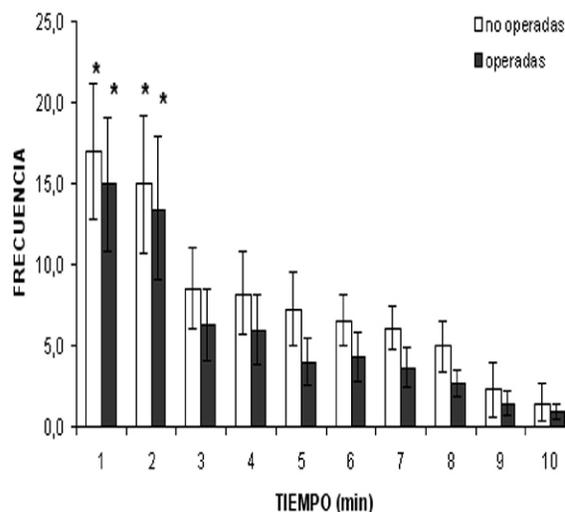


Fig. 1. Comparación entre ratas no operadas y ratas operadas. Frecuencia de la contracción de la pata, conducta producida por la inyección subcutánea ($50 \mu\text{L}$) de formalina (5%), medida minuto a minuto, durante 10 minutos (Fase 1).

* = $p < 0,05$.

aumentó 2 veces su valor inicial en relación a la línea base previa, un minuto después de la inyección de formalina; luego descendió y se mantuvo así el resto del tiempo ($F(22/110) = 1,63$; $p < 0,03$) (Fig. 2A).

Glutamato: La concentración basal de glutamato fue $0,70 \pm 0,10 \mu\text{M}$. El glutamato aumentó 3 veces el valor inicial después de la inyección de formalina y luego descendió rápidamente en el minuto siguiente, luego vuelve a ascender un poco, para descender y mantenerse bajo el resto del tiempo ($F(22/110) = 2,93$; $p < 0,002$) (Fig. 2B).

Aspartato: La concentración basal de aspartato fue $0,80 \pm 0,10 \mu\text{M}$. El aspartato aumentó después de la inyección de formalina, pero las variaciones de las dos curvas no fueron estadísticamente significativas ($F(22/110) = 0,89$; $p \text{ n.s.}$) (Fig. 2C).

Amígdala

Arginina: La concentración basal de arginina fue $0,90 \pm 0,08 \mu\text{M}$. Después de la inyección de formalina, la arginina aumen-

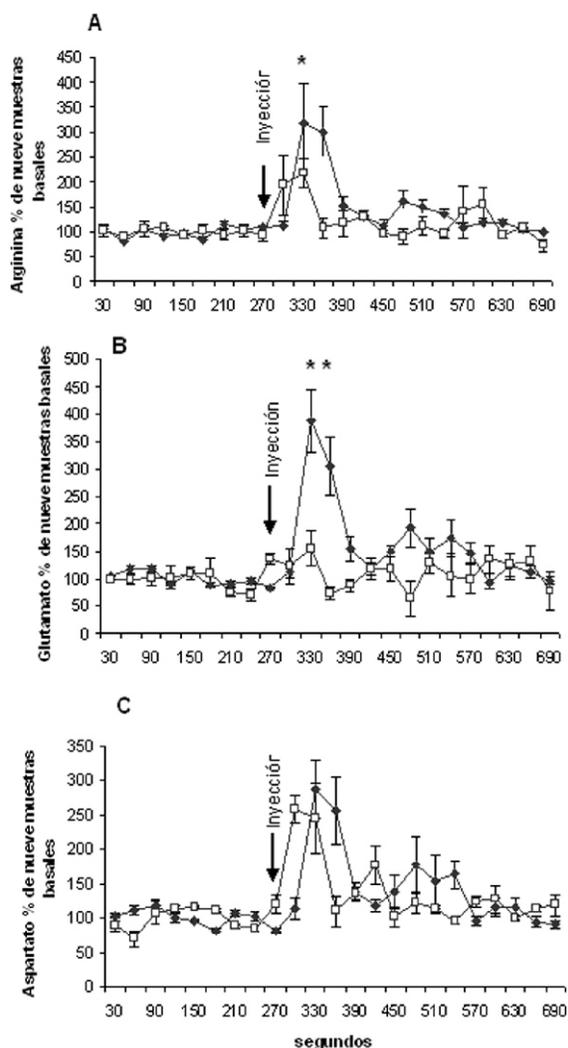


Fig. 2. A: Arginina en el núcleo *accumbens*. Después de la inyección de formalina (rombos negros), la arginina aumentó comparado con los valores basales previos ($p < 0,03$). B: Glutamato en el núcleo *accumbens*. Después de la inyección de formalina (rombos negros), pero no de suero fisiológico (cuadrados blancos) el glutamato aumentó ($p < 0,002$) C: Aspartato en el núcleo *accumbens*. Después de la inyección de formalina (rombos negros) y de suero fisiológico (cuadrados blancos) el aspartato aumentó de manera semejante en ambos grupos (p n.s.).

* = $p < 0,03$. ** = $p < 0,002$.

tó más de dos veces el nivel inicial y descendió rápidamente y se mantuvo así algunos minutos, para volver a ascender pero menos y volver a descender a los niveles basales ($F(22/110) = 1,60$; $p < 0,05$) (Fig. 3A).

Glutamato: La concentración basal de glutamato fue $1,00 \pm 0,20 \mu\text{M}$. El glutamato aumentó 6 veces su valor inicial, después de la inyección de formalina, y luego descendió rápidamente, durante algunos minutos se mantuvo en los niveles basales, para luego volver a ascender y descender rápidamente a los valores basales ($F(22/110) = 1,62$; $p < 0,05$) (Fig. 3B).

Aspartato: La concentración basal de aspartato fue $1,00 \pm 0,09 \mu\text{M}$. El aspartato aumentó 2,5 veces el valor inicial, breve, pero significativamente, después del estímulo nocivo; después se mantuvo bajo, para volver a ascender y descender rápidamente, retornando a los valores basales ($F(22/110) = 1,61$; $p < 0,05$) (Fig. 3C).

DISCUSIÓN

En el experimento presente la conducta relacionada con el dolor, que es la contracción de la pata después de la inyección de formalina, fue más frecuente en el primer y segundo minuto, mientras que la inyección de solución salina no produjo ninguna respuesta de dolor (no mostrado). No se encontraron diferencias entre el grupo no operado y el grupo de ratas operadas para microdiálisis. La aplicación de la inyección de formalina en la pata trasera de las ratas incrementó la concentración de glutamato y arginina en el líquido extracelular de la parte central del Nac y en el núcleo basolateral de la amígdala se encontró un aumento de arginina, glutamato y aspartato. Nuestros resultados mostraron una muy buena asociación temporal entre el aumento de los aminoácidos y la conducta provocada por el dolor (Fig. 1).

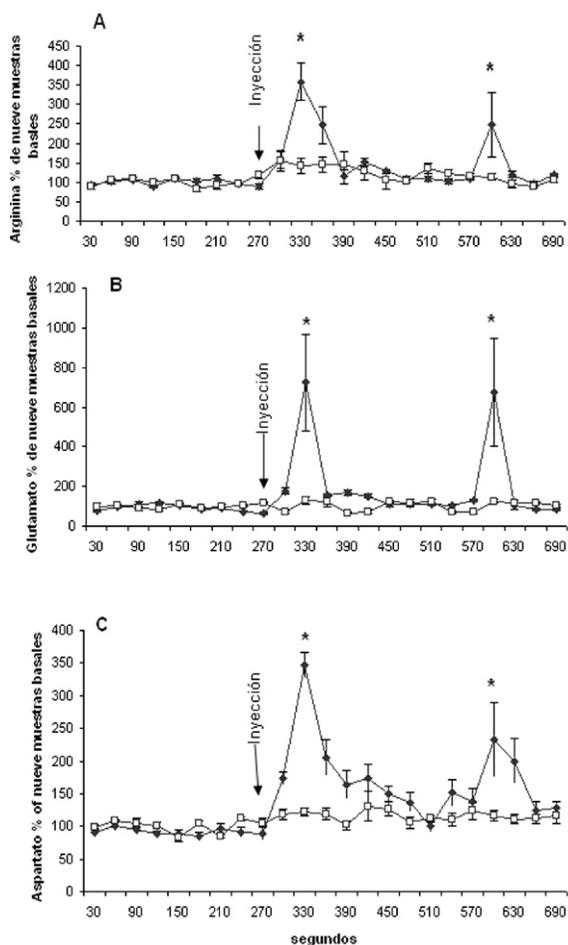


Fig. 3. **A:** Arginina en la amígdala. Después de la inyección de formalina (rombos negros), la arginina aumentó de forma bimodal en relación a la línea base previa ($p < 0,05$). **B:** Glutamato en la amígdala. Después de la inyección de formalina (rombos negros), pero no suero fisiológico (cuadrados blancos) el glutamato aumentó breve pero significativamente ($p < 0,05$), de forma bimodal. **C:** Aspartato en la amígdala. Después de la inyección de formalina (rombos negros), pero no de suero fisiológico (cuadrados blancos), el aspartato aumentó ($p < 0,05$) brevemente de forma bimodal.
* = $p < 0,05$.

El aumento de glutamato causaría excitación de las neuronas de la parte central del Nac porque el glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante del cerebro (34). Los estímulos dolorosos excitan algunas neuronas en el Nac y las inyecciones intratecales de glutamato potencian el aumento de la descarga de las neuronas del Nac durante el dolor (9). Actualmente se acepta que el Nac participa en el dolor, las reacciones de placer y aversión y en la actividad locomotora general (35). La inyección de morfina directamente en el Nac produce analgesia en el test de la formalina (36, 37). En general, se ha observado que cuando el animal recibe un estímulo placentero, como por ejemplo alimento después de un ayuno forzado, la concentración de glutamato en el líquido extracelular del núcleo *accumbens* disminuye (38). Al contrario, cuando un animal recibe un estímulo aversivo, la concentración extracelular de glutamato aumenta. Por ejemplo, la aplicación de un sonido previamente asociado con un shock eléctrico aplicado a las patas del animal, y de diversas formas de estrés como la inmovilización forzada (39, 40) aumentan el glutamato extracelular en el Nac. Nuestros experimentos permiten asociar el aumento de glutamato de la parte central del Nac con la percepción del carácter aversivo del estímulo. En efecto, la inyección de formalina induce, en los primeros segundos, varios comportamientos como contracción de la pata estimulada, lamerse la pata, dejar de apoyarla en el piso, vocalizar y permanecer inmóvil, que indican aversión. Los resultados aquí reportados muestran que el incremento de glutamato en la parte central del Nac ocurre en los primeros treinta segundos después de la inyección de formalina y por lo tanto hay una buena correlación temporal entre las respuestas que indican aversión y la elevación de glutamato extracelular en el Nac. La liberación de glutamato de la parte central del Nac inducida

por la inyección de formalina esté asociada a la sensación desagradable que se produce durante el dolor.

El Nac es uno de los sustratos del sistema de control de la actividad locomotora general (35). La inhibición de las neuronas del Nac causa aumento de la actividad locomotora. Las inyecciones de bloqueadores de los receptores glutamatérgicos tipo NMDA aumentan la actividad locomotora general y las inyecciones de glutamato la disminuyen (41, 42). Es probable que el incremento de glutamato encontrado en el presente trabajo contribuya a la inmovilidad general producida por el estímulo doloroso.

En este trabajo las concentraciones de glutamato y aspartato aumentaron en los dializados del núcleo basolateral de la amígdala. Estudios conductuales y con microdialisis muestran que el dolor inducido experimentalmente por una inyección intraplantar de formalina produce aversión al lugar asociado con la inyección y que dicha aversión coincide con un incremento de glutamato que a su vez activa receptores NMDA en el núcleo basolateral de la amígdala, y las inyecciones de morfina en el núcleo basolateral de la amígdala eliminan tanto el condicionamiento aversivo como la liberación de glutamato (20). El incremento de glutamato y aspartato siguió un curso temporal bimodal, es decir, hubo dos incrementos de cada uno de estos aminoácidos excitadores y los dos incrementos estuvieron separados por un lapso de 3 a 4 minutos. Se cree que el primer aumento (tanto del comportamiento, como de los aminoácidos excitadores) se debe a la sensación dolorosa causada por la excitación de terminaciones nerviosas libres asociadas a fibras mielínicas tipo A delta que tienen una conducción rápida. El segundo componente se ha asociado a la estimulación de fibras amielínicas tipo C. Lo interesante es que los dos componentes de la respuesta neuroquímica aparecen en la amígdala la cual es un cen-

tro nervioso que no está asociado directamente a la sensación dolorosa sino a fenómenos emocionales como la aversión y la depresión.

Existen abundantes evidencias de que la amígdala es activada por estímulos aversivos en general y por el dolor en particular. Las evidencias se han obtenido tanto en estudios de fMRI en seres humanos (43-49) como en estudios experimentales en los cuales se midió el flujo sanguíneo cerebral mediante la autorradiografía (50). En la mayoría de estos estudios se observa activación de la amígdala. En otros estudios han sido trazadas las vías anatómicas que conectan los centros nerviosos del dolor en la corteza cerebral y el tálamo con la región basolateral de la amígdala (51-55) así como los centros nerviosos del dolor en la médula espinal y el tallo cerebral también con la amígdala (56, 57). Existen además evidencias que demuestran que la presentación de un estímulo aversivo a un animal aumenta los niveles de glutamato en la amígdala particularmente cuando el animal ha sido condicionado. La presencia de una solución sávida y novedosa dentro de la boca de un animal que fue sometido a condicionamiento aversivo, causa un gran incremento de glutamato en el núcleo basolateral de la amígdala (58). Por lo tanto, es muy probable que el incremento de glutamato en el núcleo basolateral de la amígdala que encontramos en el presente experimento esté relacionado con las sensaciones de aversión que acompañan al dolor.

Tanto en el Nac como en el núcleo basolateral de la amígdala, el estímulo doloroso causó incremento de los niveles extracelulares de arginina, que es el aminoácido precursor del NO. Este incremento inducido por el dolor ha sido encontrado en trabajos previos de nuestro grupo (22, 24). El glutamato que se libera actúa sobre los receptores glutamatérgicos ubicados en las células gliales y estas liberan arginina. Esta

arginina entra en las neuronas glutamatérgicas y produce NO mediante la activación de un pool sustrato dependiente de la enzima NOS. Sin embargo, hay varios experimentos que demuestran que se requiere el NO en la amígdala lateral para que se produzca la memoria de eventos aversivos (59). Las inyecciones de L-arginina en el núcleo *accumbens* producen condicionamiento de preferencia por el lugar en el cual la rata las recibió (60).

En conclusión, el presente trabajo muestra datos experimentales que sugieren que la arginina y el glutamato son liberados en el Nac y en el núcleo basolateral de la amígdala durante la estimulación nociceptiva (test de la formalina, fase I) y que esta liberación puede indicar la existencia de un mecanismo que explique cómo se producen los componentes afectivos del dolor, como la aversión.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación pudo realizarse gracias al apoyo del Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad de los Andes (Mérida, Venezuela) a través de los proyectos M-821-05-03-A.

REFERENCIAS

1. **Roger RJ.** Influence of intra amygdaloid opiate injection on shock threshold, tail flick latencies and open field behavior in rats. *Brain Res* 1978; 153:211-216.
2. **Herz A, Albus K, Metys J, Schubert P, Teschmacher H.** On the central sites of the antinociceptive action of morphine and fentanyl. *Neuropharmacology* 1970; 9:539-551.
3. **Yaksh L, Rudy TA.** Narcotics analgesia: CNS sites and mechanism of action as revealed by intracerebral injection techniques. *Pain* 1978; 4:71-78.
4. **Dill RE, Costa E.** Behavioral dissociation of the enkephalinergic system of the nucleus accumbens and nucleus caudate. *Neuropharmacology* 1977; 16:323-326.
5. **Ma QP, Han JS.** Naloxone blocks opioid peptide release in the periaqueductal gray and amygdala elicited by morphine injected into Nucleus Accumbens. *Peptides* 1992; 13:261-265.
6. **Schmidt BL, Tambeli CH, Levine JD, Gear RW.** Mu/delta cooperativity and opposing kappa-opioid effects in nucleus accumbens-mediated antinociception in rats. *Eur J Neurosci* 2002; 15:861-868.
7. **Narita M, Kishimoto Y, Ise Y, Yajima Y, Misawa K, Suzuki T.** Direct evidence for the involvement of mesolimbic kappa-opioid system in the morphine-induced rewarding effect under an inflammatory pain-like state. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30:111-118.
8. **Fusa K, Takahashi I, Watanabe S, Aono Y, Ikeda H, Saigusa T, Nagase H, Suzuki T, Koshikawa N, Cools AR.** The non-peptidic delta opioid receptor agonist TAN-67 enhances dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats via a mechanism that involves both glutamate and free radicals. *Neuroscience* 2005; 130:745-755.
9. **Zhang XJ, Xu MY, Ly N.** Influence of glutamate and NMDA-receptor antagonist MK-801 on the electric activities of pain-excitation neurons in the nucleus accumbens of rats. *Sheng Li Xue Bao* 2005; 571:66-70.
10. **Yu LC, Han JS.** The neural pathway from nucleus accumbens to amygdala in morphine analgesia in the rabbit. *Sheng Li Xue Bao* 1990; 42:277-283.
11. **Magnusson JE, Martin RV.** Additional evidence for the involvement of the basal ganglia in formalin-induced nociception: the role of nucleus accumbens. *Brain Res* 2002; 942:128-133
12. **Zhou ZF, Du MY, Wu WY, Jiang Y, Han JS.** Effects of intracerebral microinjection of naloxone on acupuncture and morphine analgesia in the rabbit. *Sci Sin* 1981; 24:1166-1178.
13. **Helmstetter FJ, Bellgowan PS, Tershner SA.** Inhibition of tail flick reflex following

- microinjection of morphine in the amygdala. *Neuroreport* 1995; 4:471-474.
14. **Helmstetter FJ, Bellgowan PSF, Poore LH.** Microinfusion of mu but not delta o kappa opioid antagonist in the basolateral amygdala results in inhibition of tail flick reflex in pentobarbital anesthetized rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275:381-388.
 15. **Pavlovic ZW, Cooper ML, Bodnar R.** Opioid antagonist in periaqueductal gray inhibit morphine and beta endorphin analgesia elicited by the amygdala of rat. *Brain Res* 1996; 741:13-26.
 16. **Pavlovic ZW, Bodnar RJ.** Opioid supraspinal analgesia synergy between the amygdala and the periaqueductal gray in rats. *Brain Res* 1998; 779:158-169.
 17. **Fox JR, Sorensen CA.** Bilateral lesions in the amygdala attenuate analgesia induced by diverse environmental challenges. *Brain Res* 1994; 648:215-221.
 18. **Guirimand F, Le Bars D.** Physiology of nociception. *Ann Fr Anesth Reanim* 1996; 15:1048-1079.
 19. **Helmstetter FJ, Tershner SA, Poore LH, Bellgowan PSF.** Antinociception following opioid stimulation of the basolateral amygdala is expressed through the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Brain Res* 1998; 779:104-118.
 20. **Minami M.** Molecular pharmacology of opioid receptors. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2004; 123:95-104.
 21. **Shors TJ, Elkabes S, Selcher JS, Black IB.** Stress persistently increases NMDA receptor mediated binding (3H) PDBu (a marker for protein kinase C) in the amygdala, and re-exposure to the stressful context reactivates the increase. *Brain Res* 1997; 750:293-300.
 22. **Silva E, Quiñonez B, Freund N, Gonzalez LE, Hernandez L.** Extracellular glutamate, aspartate and arginine in the ventral posterolateral thalamic nucleus during nociceptive stimulation. *Brain Res* 2001; 923:45-49.
 23. **Abarca C, Silva E, Sepulveda J, Oliva P, Contreras E.** Neurochemical changes after morphine, Dizocilpine or riluzole in the ventral posterolateral thalamic nuclei of rats with hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* 2000; 403:67-74.
 24. **Silva E, Hernandez L, Contreras Q, Guerrero F, Alba G.** Noxious stimulation increased glutamate and arginine in the periaqueductal gray matter in rats: a microdialysis study. *Pain* 2000; 80:131-135.
 25. **Fundytus ME.** Glutamate receptors and nociception. Implications for the drug treatment of pain. Review article. *CNS Drugs* 2001; 15:29-57.
 26. **Meller ST, Gebhart GF.** Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 1993; 52:127-136.
 27. **Moncada S, Palmer RMJ, Higgins A.** Nitric oxide. Physiology, pathology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142.
 28. **Grima G, Benz B, Do KQ.** Glial-derived arginine, the nitric oxide precursor, protects neurons from NMDA-induced excitotoxicity. *Eur J Neurosci* 2001; 14:1762-1770.
 29. **Hernandez L, Stanley BG, Hoebel BG.** A small removable microdialysis probe. *Life Sci* 1986; 39:2629-2637.
 30. **Hernandez L, Tucci S, Guzman N, Paez X.** *In vivo* monitoring glutamate in the brain by microdialysis in the laser induced fluorescence detection. *J Chromatography* 1993; 625:393-398.
 31. **Paxinos G, Watson C.** The rat brain in stereotaxic coordinates, Second Ed. 1986, Academic Press, San Diego. USA.
 32. **Wheeler-Aceto A, Porreca F, Cowan A.** The rat formalin test: comparison of noxious agents. *Pain* 1990; 40:229-223.
 33. **Malmberg A, Yaksh T.** Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E₂ and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in anesthetized rats. *J Neurosci* 1995; 15:2768-2776.
 34. **Cooper JR, Bloom FE, Roth RH.** The Biochemical Basis of Neuropharmacology. Cap 6 Amino Acid Transmitters. Seventh Edition. 1996. Oxford University Press. New York; pp171-193.
 35. **Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY.** From motivation to action: fundamental interface between the limbic system and the

- motor system. *Prog Neurobiol* 1980; 14:69-97.
36. **Manning BH, Morgan MJ, Franking KB.** Morphine analgesia in the formalin test: evidence for forebrain and midbrain sites of action. *Neuroscience* 1994; 63:284-294.
37. **Xuan YT, Shi YS, Zhorn ZF, Han JS.** Studies on the mesolimbic loop of antinociception II. A serotonin-enkephalin interaction in the nucleus accumbens. *Neuroscience* 1982; 19:403-409.
38. **Rada P, Tucci S, Murzi E, Hernández L.** Extracellular glutamate increases in the lateral hypothalamus and decreases in the nucleus accumbens during feeding. *Brain Res* 1997; 768:338-340.
39. **Saul'skaya NB, Solov'eva NA, Savel'ev SA.** Glutamate release in the nucleus accumbens during competitive presentation of aversive and appetitive stimuli. *Neurosci Behav Physiol* 2006; 36:247-252.
40. **Moghaddam B.** Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem* 1993; 60:1650-1657.
41. **Druhan JP, Rajabi H, Stewart J.** MK-801 increases locomotor activity without elevating extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens. *Synapse* 1996; 24:135-146.
42. **Leonibus E, Mele A, Oliverio A, Pert A.** Locomotor activity induced by the non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801: role of nucleus *accumbens* efferent pathways. *Neuroscience* 2001; 104:105-116.
43. **Becerra LR, Breiter HC, Stojanovic M, Fishman S, Edwards A, Comite AR, Gonzalez RG, Borsook D.** Human brain activation under controlled thermal stimulation and habituation to noxious heat: an fMRI study. *Magn Reson Med* 1999; 41:1044-1057.
44. **Bingel U, Quante M, Knab R, Bromm B, Weiller C, Buchel C.** Subcortical structures involved in pain processing: evidence from single-trial fMRI. *Pain* 2002; 99:313-321.
45. **Bonaz B, Baciú M, Papillon E, Bost R, Gueddah N, Le Bas JF, Fournet J, Segebarth C.** Central processing of rectal pain in patients with irritable bowel syndrome: an fMRI study. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:654-661.
46. **Bornhovd K, Quante M, Glauche V, Bromm B, Weiller C, Buchel C.** Painful stimuli evoke different stimulus-response functions in the amygdala, prefrontal, insula, and somatosensory cortex: a single-trial fMRI study. *Brain* 2002; 125(Pt 6):1326-1336.
47. **Derbyshire SW, Jones AK, Gyulai F, Clark S, Townsend D, Firestone LL.** Pain processing during three levels of noxious stimulation produces differential patterns of central activity. *Pain* 1997; 73:431-445.
48. **Schneider F, Habel U, Holthusen H, Kessler C, Posse E, Muller-Gartner HW, Arndt JO.** Subjective ratings of pain correlate with subcortical-limbic blood flow: an fMRI study. *Neuropsychobiology* 2001; 43:175-178.
49. **Villemure C, Wassimi S, Bennett GJ, Shir Y, Bushnell MC.** Unpleasant odors increase pain processing in a patient with neuropathic pain: psychophysical and fMRI investigation. *Pain* 2006; 120:213-220.
50. **Paulson PE, Casey KL, Morrow TJ.** Long-term changes in behavior and regional cerebral blood flow associated with painful peripheral mononeuropathy in the rat. *Pain* 2002; 95:31-40.
51. **Doron NN, Ledoux JE.** Cells in the posterior thalamus Project to both amygdala and temporal cortex: a quantitative retrograde double-labeling study in the rat. *J Comp Neurol* 2000; 425:257-274.
52. **Doron NN, Ledoux JE.** Organization of projections to the lateral amygdala from auditory and visual areas of the thalamus of the rat. *J Comp Neurol* 2000; 417:385-386.
53. **Linke R.** Differential projection patterns of superior and inferior collicular neurons onto posterior paralaminar nuclei of the thalamus surrounding the medial geniculate body in the rat. *Eur J Neurosci* 1999; 11:187-203.

54. **Pitkanen A, Savander V, LeDoux JE.** Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdale. *Trends in Neurosci* 1997; 20:517-523.
55. **Shi C, Davis M.** Pain pathways involved in fear conditioning measured with fear-potentiated startle: lesions study. *J Neurosci* 1999; 19:420-430.
56. **Bourgeois L, Gauriau C, Bernard JF.** Projections from the nociceptive area of central nucleus of the amygdala to the forebrain: a PHA-L study in the rat. *Eur J Neurosci* 2001; 14: 229-255.
57. **Jasmin L, Burkey AR, Card JP, Basbaum AL.** Transneuronal labeling of a nociceptive pathway, the spino-(trigemino-) parabrachio-amygdaloid, in the rat. *J Neurosci* 1997; 17: 3751-3765.
58. **Tucci S, Rada P, Hernandez L.** Role of glutamate in the amygdala and lateral hypothalamus in conditioned test aversion. *Brain Res* 1988; 8:44-49.
59. **Schafe GE, Bauer EP, Rosis S, Farb CR, Rodríguez SM, LeDoux JE.** Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala. *Eur J Neurosci* 2005, 22: 201-211.
60. **Sahraei H, Pirzadeh-Jahromi G, Noorbakhsnia M, Asgari A, Haeri-Rohani A, Khoshbaten A, Poorheidari GR, Sepehri H, Ghoshooni H, Zarrindast MR.** Involvement of nucleus accumbens in L-arginine-induced conditioned place preference in rats. *Behav Pharmacol* 2004; 15:473-480.