

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y  
PARASITOLOGÍA

EVOLUCIÓN DEL CEREBRO EMOCIONAL : ANÁLISIS  
COMPARADO DE LAS VÍAS AMÍGDALO-ESTRIATALES

MARÍA DE LOS DESAMPARADOS NOVEJARQUE GADEA

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 8 de Gener de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Agustín González Gallegos
- D. Ceri Davies
- D. Alino Martínez Marcos
- D. Vicent Teruel Martí
- D. Juan Nácher Roselló

Va ser dirigida per:

D. Fernando Martínez García

D. Enrique Lanuza Navarro

©Copyright: Servei de Publicacions  
María de los Desamparados Novejarque Gadea

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7077-3

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y  
PARASITOLOGÍA

EVOLUCIÓN DEL CEREBRO EMOCIONAL : ANÁLISIS  
COMPARADO DE LAS VÍAS AMÍGDALO-ESTRIATALES

MARÍA DE LOS DESAMPARADOS NOVEJARQUE GADEA

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 8 de Gener de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Agustín González Gallegos
- D. Ceri Davies
- D. Alino Martínez Marcos
- D. Vicent Teruel Martí
- D. Juan Nácher Roselló

Va ser dirigida per:

D. Fernando Martínez García

D. Enrique Lanuza Navarro

©Copyright: Servei de Publicacions  
María de los Desamparados Novejarque Gadea

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7077-3

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

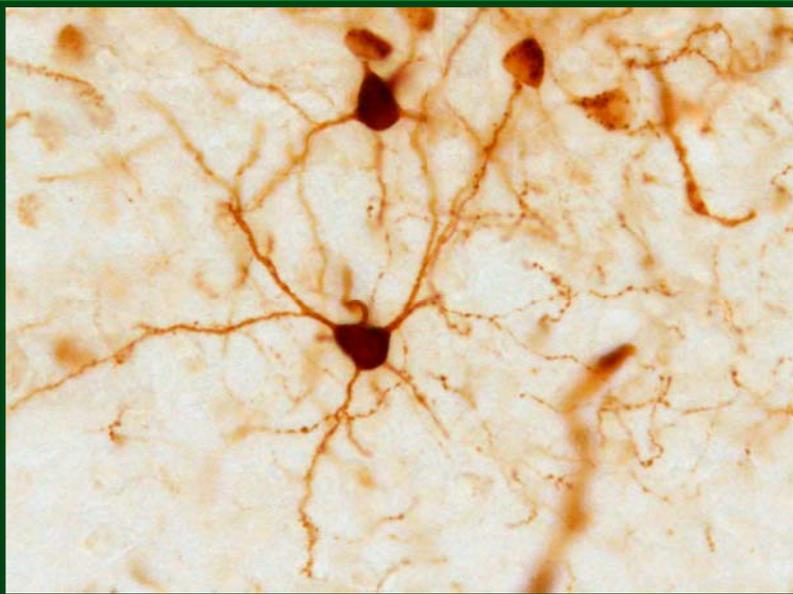


VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



Facultat de Ciències Biològiques  
Departament de Biologia Funcional i Antropologia Física  
Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia

# Evolución del Cerebro Emocional: Análisis Comparado de las Vías Amígdalo-Estriatales



TESIS DOCTORAL  
Amparo Novejarque Gadea  
2007



Departament de Biologia Funcional  
i Antropologia Física

Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia

EVOLUCIÓN DEL CEREBRO  
EMOCIONAL:  
ANÁLISIS COMPARADO DE LAS  
VÍAS AMÍGDALO-ESTRIATALES

Tesis Doctoral

Amparo Novejarque Gadea

València, 2007



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Ciències Biològiques

Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia

Departament de Biologia Funcional  
i Antropologia Física

D. Fernando Martínez García y D. Enrique Lanuza Navarro, doctores en Biología y Profesores Titulares de los Departamentos de Biología Funcional y Antropología Física y de Parasitología y Biología Celular de la Universidad de Valencia

### C E R T I F I C A N

que Dña. **Amparo Novejarque Gadea**, licenciada en Biología por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado *“Evolución del Cerebro Emocional: Análisis Comparado de las Vías Amígdalo-Estriatales”* para la obtención del grado de Doctor en Biología.

Para que conste, en cumplimiento de la legislación, firmamos el presente certificado en:

Valencia a 11 de octubre de 2007

Dr. Fernando Martínez García

Dr. Enrique Lanuza Navarro

Para la realización de esta tesis, la autora ha sido beneficiaria de una beca del Programa Propio de Becas de Investigación Predoctorales ‘V Segles’ concedida por la Universidad de Valencia (convocatoria del 18 de septiembre de 2001) según la resolución del 13 de marzo de 2002 del Vicerrectorado de Investigación.

Este trabajo se ha enmarcado dentro del proyecto “Identificación y estudio de conexiones del *pallium* ventral del telencéfalo del ratón”, financiado por la Conselleria de Cultura, Educació i Ciència (GV2000-161-05)

A vosaltres papàs, iaia i tete,  
perquè sempre heu cregut en mi

*“Las ideas no duran mucho. Hay que hacer algo con ellas”*

Santiago Ramón y Cajal

## AGRAÏMENTS

Agrair a tots aquells que, de manera directa o indirecta, heu contribuït en tot este procés seria pràcticament impossible. I és que cadascuna de les persones que heu format part de ma vida heu tingut un impacte en mi i, per tant, en esta Tesi.

Fernando, saps que t'estaré eternament agraïda per donar-me l'oportunitat de demostrar que era capaç. A tu Quique t'agraisc tots eixos moments en els que m'has donat la clau per a continuar endavant. A tots dos vos considere els meus pares científics. M'heu deixat la més bonica de les herències, tots els coneixements que hui tinc sobre este preciós camp de la ciència. Per esta i per tantes altres raons em sent molt honrada d'haver segut la vostra deixeble.

Si Fernando i Quique han segut els meus pares, vosaltres, companys de penúries, heu segut els meus germans en ciència. Ha segut un plaer fer este camí junts, aprenent els uns dels altres i donant-nos el suport que ú ha necessitat quan l'altre ha caigut.

A vosaltres amics vos agraisc els moments de distensió, tan necessaris per a la salut mental del doctorand i tot el suport que m'heu donat durant tot este temps. Finally I did it!.

A vosaltres família no podré agrair-vos mai tot el que heu fet per la meua educació i la meua formació tot i quan no va ser fàcil. Em sent tan orgullosa de vosaltres. A vosaltres i a la meua família bònica vos dec la voluntat de continuar endavant i de voler ser cada vegada millor persona.

Per últim, vull agrair a la pròpia Tesi tot el que ha fet per mi. Gràcies a ella ni sóc la mateixa persona que la va començar, ja fa un fum de temps, ni seré la mateixa que hui sóc. He crescut, tant professionalment com personalment, i això ho he d'agrair al fet d'haver viscut este dur, però alhora gratificant repte. M'he hagut d'enfrontar amb les meues limitacions i he hagut de trobar la manera de fer-lis front. He après un poquet de ciència i molt de la vida i, sobretot, de mi mateixa. I és que este ha segut només el principi...

# Índice General

PRESENTACIÓN.....	xii
ABREVIATURAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xx
LISTA DE TABLAS.....	xxii
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
1.1 LA NEUROANATOMÍA COMPARADA Y EL ORIGEN DEL NEOCÓRTEX.....	2
1.2 ENTENDER EL TELENCEFALO: EL CIRCUITO BÁSICO DEL PALIO Y EL SUBPALIO.....	7
1.3 LA TOPOLOGÍA Y LA EXPRESIÓN DE LOS GENES HOMEÓTICOS DURANTE EL DESARROLLO.....	10
1.4 LOS NUEVOS DATOS APOYAN LAS VIEJAS IDEAS: IDENTIDAD DE LA AMÍGDALA DE LOS REPTILES.....	13
1.5 LAS CONEXIONES INTRATELENCEFÁLICAS DE LA AMÍGDALA, LAS GRANDES OLVIDADAS.....	15
1.6 LA AMÍGDALA: ¿UNIDAD FUNCIONAL O ARTIFICIO?.....	16
<b>CAPÍTULO 2. OBJETIVOS DE LA TESIS.....</b>	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1 ANIMALES.....	23
3.2 EXPERIMENTOS DE TRAZADO DE CONEXIONES.....	23
3.3 SOBRE LA METODOLOGÍA DEL TRAZADO DE CONEXIONES.....	27
3.4 DETECCIÓN HISTOQUÍMICA E INMUNO-HISTOQUÍMICA DE MARCADORES NEURO-QUÍMICOS.....	29
3.5 ADQUISICIÓN Y PROCESADO DE LAS IMÁGENES.....	29
<b>CAPÍTULO 4. ESTUDIO DE LAS PROYECCIONES AMÍGDALO-ESTRIATALES         EN <i>Podarcis hispanica</i>.....</b>	<b>31</b>
4.1 INTRODUCCIÓN.....	33
4.2 RESULTADOS.....	35
4.2.1 Cito y Quimioarquitectura del Polo Caudal de la DVR de <i>Podarcis hispanica</i> .....	35
4.2.2 Cito y Quimioarquitectura del Telencéfalo Basal de <i>Podarcis hispanica</i> .....	36

4.2.3	Marcaje Retrógrado en la Amígdala Palial de <i>Podarcis hispanica</i> tras Inyecciones en el Estriado.....	40
4.2.3.1	Inyecciones en el Núcleo Accumbens (Estriado Ventral).....	40
4.2.3.2	Inyecciones en el Estriado Dorsal.....	43
4.2.4	Transporte Anterógrado desde Inyecciones en la Amígdala Palial en <i>Podarcis hispanica</i> .....	44
4.2.4.1	Marcaje Anterógrado en el Telencéfalo Basal tras Inyecciones en la PDVR.....	45
4.2.4.2	Marcaje Anterógrado en el Telencéfalo Basal tras Inyecciones en el DLA.....	47
4.2.4.3	Marcaje Anterógrado en el Telencéfalo Basal tras Inyecciones en el dLC.....	49
4.2.4.4	Marcaje Anterógrado en el Telencéfalo Basal tras Inyecciones en el NS.....	50
4.3	DISCUSIÓN.....	52
4.3.1	Organización del Telencéfalo Basal de Reptiles.....	53
4.3.2	Proyecciones desde la DVR al Estriado en Reptiles.....	56
4.3.2.1	Proyecciones Vomeronasales al Estriado: El Olfatoestriado.....	57
4.3.2.2	Proyecciones al Continuo SAT-Acb: Amígdala Central Extendida.....	58
4.3.2.3	El DLA: La Principal Fuente de Proyecciones Amígdalo-Estriatales.....	59
4.3.2.4	El Sistema Vomeronasal y la Variabilidad en la Organización de la Amígdala Palial de Reptiles .....	60
4.3.2.5	Las Proyecciones Amigdalinas al Estriado y al Hipotálamo están Segregadas.....	63
4.3.3	Significado Comparado de la DVR y su Parcelación.....	63
<b>CAPÍTULO 5. ESTUDIO DE LAS PROYECCIONES AMÍGDALO-ESTRIATALES</b>		
	<b>EN <i>Mus musculus</i></b> .....	<b>65</b>
5.1	INTRODUCCIÓN.....	66
5.2	RESULTADOS.....	68
5.2.1	Arquitectura de la Amígdala del Ratón (Fig. 17).....	69
5.2.2	Marcaje Retrógrado en la Amígdala Palial del Ratón tras Inyecciones en el Estriado.....	71
5.2.2.1	Inyecciones en el Estriado Ventral.....	71
5.2.2.1.1	Inyecciones en el Área Periférica ( <i>shell</i> ) del Núcleo Accumbens.....	71
5.2.2.1.2	Inyecciones en el Área Central ( <i>core</i> ) del Núcleo Accumbens.....	74

5.2.2.1.3 Inyección en el Islote de Calleja Magno.....	75
5.2.2.2 Inyecciones en el Caudado-Putamen (Estriado Dorsal).....	75
5.2.3 Transporte Anterógrado desde Inyecciones en la Amígdala Paliar del Ratón.....	79
5.2.3.1 Marcaje Anterógrado en el Estriado tras Inyecciones en la Amígdala	
Cortical.....	79
5.2.3.1.1 Inyecciones en el Núcleo Cortical Posterior.....	79
5.2.3.1.2 Inyección en el Núcleo Cortical Anterior/Zona de Transición	
Córtico-Amigdalina.....	83
5.2.3.2 Marcaje Anterógrado en el Estriado tras Inyecciones en la Amígdala	
Profunda.....	85
5.2.3.2.1 Inyección en el Núcleo Basal Anterior.....	85
5.2.3.2.2 Inyecciones en el Núcleo Basal Posterior.....	89
5.2.3.2.3 Inyección en el Núcleo Basal Accesorio Anterior.....	90
5.2.3.2.4 Inyecciones en el Núcleo Basal Accesorio Posterior.....	91
5.2.3.2.5 Inyección en el Área Amígdalo-Hipocámpica.....	93
5.2.3.2.6 Inyecciones en el Núcleo Lateral.....	95
5.3 DISCUSIÓN.....	98
5.3.1 Proyecciones Amígdalo-Estriatales en Mamíferos.....	98
5.3.1.1 Vías Amigdalinas al Estriado Ventral.....	98
5.3.1.1.1 Proyecciones Amigdalinas al Núcleo Accumbens.....	99
5.3.1.1.2 Proyecciones al Núcleo Accumbens desde la Amígdala Cortical.....	101
5.3.1.1.3 Proyecciones al Accumbens desde la L y AHA.....	102
5.3.1.1.4 Proyecciones Amigdalinas al Tubérculo Olfativo, Puentes Celulares	
Estriatales e Islotes de Calleja.....	103
5.3.1.2 Proyecciones Amigdalinas al Caudado-Putamen.....	105
5.3.1.2.1 Proyecciones al Caudado-Putamen desde los Núcleos Profundos	
de la Amígdala.....	106
5.3.1.2.2 Proyecciones al Caudado-Putamen desde partes de la Amígdala	
Cortical.....	108
5.3.1.2.3 Bilateralidad de las Proyecciones Amigdalinas al Estriado.....	109
5.3.2 La Proyección de la Amígdala al Estriado Ventral y la Evaluación	
Emocional de los Estímulos Quimiosensoriales.....	109
5.3.3 La Proyección de la Amígdala al Caudado-Putamen y sus posibles	
Implicaciones Funcionales.....	112

<b>CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	115
6.1 LA AMÍGDALA EN LOS VERTEBRADOS AMNIOTAS.....	116
6.1.1 Territorios en la Amígdala Palial de los Mamíferos.....	116
6.1.2 Territorios en la Amígdala Palial de los Reptiles.....	119
6.1.3 Conexiones Amígdalo-Estriatales en Mamíferos y Reptiles.....	119
6.1.3.1 Proyecciones de la Amígdala Palial a la Amígdala Central Extendida y al Núcleo Accumbens.....	121
6.1.3.2 Proyecciones de la Amígdala Palial al Estriado Dorsal.....	122
6.1.3.3 Proyección Vomeronasal desde el Córtex Amigdalino al Límite entre el Núcleo Accumbens y el Tubérculo Olfativo.....	123
6.1.4 La Amígdala Palial de Reptiles y su Comparación con la de Mamíferos: Una Propuesta de Homologías.....	124
6.1.5 Identificación de la Amígdala Palial de Aves y sus Divisiones.....	127
6.1.6 La Amígdala Palial de Aves y su Comparación con la de Mamíferos y la de Reptiles: Una Propuesta de Homologías.....	130
6.1.7 La Amígdala Subpalial en Mamíferos, Reptiles y Aves.....	133
6.2 LA AMÍGDALA, FISIOLOGÍA Y COMPORTAMIENTO.....	136
6.2.1 Los Papeles del Subsistema Central/Basolateral.....	137
6.2.1.1 Expresión y Adquisición de Miedo/Aversión.....	138
6.2.1.2 Vía Amígdalo-Estriatal: La Amígdala y El Refuerzo.....	142
6.2.2 Los Papeles del Subsistema Medial.....	143
6.2.2.1 La Amígdala Vomeronasal y la Función Reproductiva.....	144
6.2.2.2 La Amígdala Extendida Medial y las respuestas Neuroendocrinas.....	144
6.2.2.3 La Amígdala Extendida Medial y el comportamiento socio-sexual.....	145
6.2.2.4 La Amígdala Vomeronasal: Comportamiento Defensivo y Miedo Desencadenado por el Depredador.....	147
6.3 LA AMÍGDALA COMO SISTEMA FUNCIONAL (FIG. 33 y 34).....	149
6.4 EVOLUCIÓN DEL CEREBRO EMOCIONAL: LA AMÍGDALA Y LA EVALUACIÓN DE ESTÍMULOS.....	151
6.5 LA AMÍGDALA Y LA EVOLUCIÓN DEL PALIO EN VERTEBRADOS.....	154
<b>CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES</b> .....	155
<b>CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	158

## PRESENTACIÓN

Esta memoria recoge el trabajo realizado en el departamento de Biología Funcional y Antropología Física de la Facultad de Ciencias Biológicas bajo la dirección del Dr. Fernando Martínez García y el Dr. Enrique Lanuza Navarro entre los años 2002 y 2007.

Este es un trabajo de neuroanatomía comparada en el que se estudian las proyecciones amígdalo-estriatales en reptiles (la lagartija *Podarcis hispanica*) y mamíferos (el ratón *Mus musculus*), por ello en el **primer capítulo** se introducirán de manera general los datos que se conocen acerca de estas conexiones en ambas especies.

En el **segundo capítulo** se señalarán los objetivos a alcanzar con los estudios neuroanatómicos en ambas especies.

En el **tercer capítulo** están contenidos los datos relativos a las técnicas experimentales utilizadas en el presente trabajo.

La presentación de los resultados se estructura en los dos capítulos siguientes, cada uno de los cuales contiene la introducción, los resultados y la discusión relativos a cada una de las especies utilizadas en esta investigación. Dado el enfoque comparado del presente trabajo, adoptamos esta atípica organización para facilitar la lectura y la discusión conjunta de los resultados obtenidos en cada una de las especies de elección.

Así, el **cuarto capítulo** se centra en los resultados obtenidos tras el trazado neuroanatómico de las conexiones amígdalo-estriatales en *Podarcis hispanica*. En este capítulo también se discuten ciertos aspectos relativos a la organización del telencéfalo basal, a las proyecciones amígdalo-estriatales y al significado comparado de la amígdala en los reptiles.

En el **quinto capítulo** se analizan los resultados obtenidos tras el estudio de las proyecciones amígdalo-estriatales mediante la inyección de trazadores neuroanatómicos en el ratón. En este capítulo se discuten nuestros datos en el contexto de las proyecciones amígdalo-estriatales en otros mamíferos y en el contexto de la evaluación emocional de los estímulos quimiosensoriales.

En el **sexto capítulo** se discuten de manera conjunta los resultados de conectividad obtenidos en reptiles y en mamíferos con el objetivo de proponer

homologías de la amígdala palial en ambos grupos de animales, así como también en aves. Además se discute desde un punto de vista funcional el papel que la amígdala ejerce en diversos comportamientos y la evolución que esta estructura ha seguido en los vertebrados amniotas.

En el **séptimo capítulo** se apuntan las conclusiones fundamentales derivadas de este trabajo.

Y, por último, el **octavo capítulo** contiene todas las notas bibliográficas utilizadas en el presente estudio.

## ABREVIATURAS

### Generales

ABC	complejo avidina-biotina
AChasa	acetil colinesterasa
BDA	dextran-amina biotinilada
CGRP	péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CRF	factor de liberación de la hormona corticotropa
DAB	3,3''-diaminobencidina
EI	estímulo incondicionado
GFAP	proteína ácida fibrilar de la glía
HRP	peroxidasa de rábano
NT	neurotensina
PAP	método peroxidasa-antiperoxidasa
PB	tampón fosfato
PBS	tampón fosfato salino
PHA-L	leucoaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
RDA	dextran-amina marcada con tetrametilrodamina
SP	sustancia P
TB	tampón Tris
TBS	tampón Tris salino
TH	tirosina hidroxilasa
TMT	2,5-dihidro-2,4,5-trimetiltiazolina

### Reptiles

<i>ac</i>	comisura anterior
Acb	núcleo accumbens
ADVR	cresta dorsal ventricular anterior
AOB	bulbos olfativos accesorios
AONv	núcleo olfativo anterior ventral
<i>aot</i>	tracto olfativo accesorio
BST	núcleo de la <i>stria terminalis</i> (BSTl: lateral; BSTm: medial)
DBN	núcleo de la banda diagonal

DBNv	núcleo de la banda diagonal, rama ventral
DC	córtex dorsal
DLA	núcleo dorsolateral amigdalino
dLC	córtex lateral profundo
DSt	estriado dorsal
DVR	cresta dorsal ventricular
GP	globo pálido ( <i>globus pallidus</i> )
LA	amígdala lateral
LC	córtex lateral
LCd	córtex lateral dorsal
LCv	córtex lateral ventral
<i>lfb</i>	tracto prosencefálico lateral
LHA	área hipotalámica lateral
<i>lot</i>	tracto olfativo lateral
MA	amígdala medial
MC	córtex medial
<i>mfb</i>	tracto prosencefálico medial
MPA	área preóptica medial
MPN	núcleo preóptico medial
Naot	núcleo del tracto olfativo accesorio
Nlot	núcleo del tracto olfativo lateral
Nmfb	núcleo del tracto prosencefálico medial
NS	núcleo esférico
OT	tubérculo olfativo
PDVR	cresta dorsal ventricular posterior
PT	engrosamiento palial
PVA	área periventricular
RC	área retroquiasmática
Rot	núcleo rotundo
S	septum
SAT	área de transición estriado-amigdalina
SATl	área de transición estriado-amigdalina, parte lateral

SATm	área de transición estriado-amigdalina, parte medial
Si	núcleo septal impar
sm	<i>stria medullaris</i>
SO	núcleo supraóptico
st	<i>stria terminalis</i>
TS	<i>torus semicircularis</i>
VAA	amígdala ventral anterior
VP	pálido ventral ( <i>pallidum ventral</i> )
VPA	amígdala ventral posterior
zl	<i>zona limitans</i>

### **Mamíferos**

AA	área anterior amigdalina (AAD: dorsal; AAV: ventral)
AB	núcleo basal accesorio (o basomedial) amigdalino (ABa: anterior; ABp: posterior)
ac	comisura anterior ( <i>aca</i> : parte anterior; <i>acp</i> : parte posterior)
Acb	núcleo accumbens (AcbC: área central del Acb, del inglés <i>core of the nucleus</i> ; AcbSh: área periférica del Acb, del inglés <i>shell of the nucleus</i> ; LAcbSh: área periférica lateral; MAcbSh: área periférica medial)
AHA	área amígdalo-hipocámpica (AHA <sub>L</sub> : división lateral; AHA <sub>M</sub> : división medial)
AOB	bulbos olfativos accesorios
APir	área de transición amígdalo-piriforme
AStr	área de transición amígdalo-estriatal
B	núcleo basal (o basolateral) amigdalino (Ba: anterior; Bp: posterior; Bv: ventral)
BAOT	núcleo del tracto olfativo accesorio
BST	núcleo de la <i>stria terminalis</i>
CB	puentes celulares del estriado ventral
Ce	núcleo central amigdalino (CeC: división capsular o paracapsular; CeL: división lateral; CeM: división medial)
Cl	claustró
COAa	núcleo cortical anterior amigdalino

COAp	núcleo cortical posterolateral amigdalino
COApm	núcleo cortical posteromedial amigdalino
CPu	caudado-putamen (estriado dorsal)
CxA	zona de transición cortico-amigdalina
DEn	núcleo endopiriforme dorsal
EA	amígdala extendida
ec	cápsula externa
HDB	núcleo de la banda diagonal, rama horizontal
I	núcleos intercalados de la amígdala
ic	cápsula interna
ICj	islotos de Calleja
ICjM	islote de Calleja magno
IPAC	núcleo intersticial de la rama posterior de la comisura anterior
L	núcleo lateral amigdalino (Lvl: ventrolateral; Ldl: dorsolateral; Lm: medial)
LGP	globo pálido lateral ( <i>globus pallidus</i> lateral)
lot	tracto olfativo lateral
LOT	núcleo del tracto olfativo lateral (1: capa 1; 2: capa 2; 3: capa 3)
LSS	banda lateral del estriado
Me	núcleo medial amigdalino (MeA: anterior; MeP: posterior; MePV: posterior ventral; MePD: posterior dorsal)
MOB	bulbos olfativos principales
MPO	núcleo preóptico medial
OB	bulbo olfativo
Pir	córtex piriforme
S	septum
SI	<i>substantia innominata</i>
st	<i>stria terminalis</i>
TR	área de transición postpiriforme
Tu	tubérculo olfativo
VEn	núcleo endopiriforme ventral
VMH	núcleo ventromedial hipotalámico
VP	pálido ventral ( <i>pallidum</i> ventral)

## Aves

AA	arcopallio anterior (antes arquiestriado anterior)
Acb	núcleo accumbens (antes porción medial del <i>lobus paraolfactorius</i> )
AD	arcopallio dorsal (antes arquiestriado intermedio dorsal)
AM	arcopallio medial (arquiestriado medial)
APH	área parahipocámpica
AV	arcopallio ventral (antes arquiestriado intermedio ventral)
Bas	núcleo basorostral palial (antes núcleo basal)
BST	núcleo de la <i>stria terminalis</i> (BSTl: lateral; BSTm: medial)
CDL	área corticoidea dorsolateral
Cl	claustró
CPi	córtex piriforme
DLP	núcleo dorsolateral posterior talámico
E	entopallio (antes ectoestriado)
ECu	núcleo cuneado externo
FA	tracto fronto-arcopallial (antes fronto-arquiestriatal)
GP	glóbo pálido (paleoestriado primitivo)
Hp	hipocampo
ICo	núcleo intercolicular
INP	núcleo intrapeduncular
L	campo L del NC
LAD	lámina arcopallial dorsal
<i>lfb</i>	tracto prosencefálico lateral
LM	lámina mesopallial
LPS	lámina palio-subpallial
LSt	estriado lateral (paleoestriado aumentado)
M	mesopallio ventral (hiperestriado ventral)
N	nidopallio (antes neoestriado)
NC	nidopallio caudal (antes neoestriado caudal; NCL: lateral; NCM: medial)
OB	bulbos olfativos
<i>om</i>	tracto occipito-mesencefálico
OV	núcleo ovoidal

PoA	núcleo posterior de la amígdala palial (antes arquiestriado posterior)
Rot	núcleo rotundo
S	septum
SpA	amígdala subpalial (antes paleoestriado ventral)
SN	<i>substantia nigra</i>
TPO	área temporo-parieto-occipital de los hemisferios cerebrales
TnA	núcleo <i>taeniae</i> de la amígdala
<i>tsm</i>	tracto septopalio-mesencefálico
Tu	tubérculo olfativo

## Lista De Figuras

<b>Figura 1:</b> Proyecciones Visuales, Somatosensoriales y Auditivas a la DVR en Aves y Reptiles.....	4
<b>Figura 2:</b> Hipótesis de Karten (1997) sobre las Homologías del Neocórtex de Mamíferos y la DVR de Saurópsidos.....	6
<b>Figura 3:</b> Organización de los Hemisferios Cerebrales en los Vertebrados.....	10
<b>Figura 4:</b> Comparación Esquemática de los derivados Paliales y Subpaliales en el Telencéfalo Rostral y Caudal de Mamíferos y Aves.....	13
<b>Figura 5:</b> Anatomía Macroscópica de la Amígdala de Mamíferos.....	18
<b>Figura 6:</b> Organización Estructural y Funcional de la Amígdala.....	19
<b>Figura 7:</b> Cito y Quimioarquitectura del Complejo Amigdalino en la Lagartija.....	41
<b>Figura 8:</b> Marcaje Retrógrado en la PDVR y Áreas Vecinas tras una Inyección de Trazador en el Núcleo Accumbens.....	45
<b>Figura 9:</b> Mapa del Marcaje Retrógrado Telencefálico tras la Inyección en el Núcleo Accumbens.....	46
<b>Figura 10:</b> Aferencias Telencefálicas al Estriado Dorsal de <i>Podarcis</i> .....	48
<b>Figura 11:</b> Marcaje Anterógrado en el Estriado tras Inyecciones de Trazadores en el Complejo Amigdalino.....	49
<b>Figura 12:</b> Eferencias Intratelencefálicas de la PDVR.....	50
<b>Figura 13:</b> Proyecciones Intratelencefálicas del DLA.....	52
<b>Figura 14:</b> Proyecciones Intratelencefálicas del dLC.....	54
<b>Figura 15:</b> Proyecciones Intratelencefálicas del NS.....	55
<b>Figura 16:</b> El Sistema Vomeronasal y la Variabilidad en la Organización de la Amígdala Palial de Reptiles.....	65
<b>Figura 17:</b> Citoarquitectura del Complejo Amigdalino del Ratón.....	75
<b>Figura 18:</b> Marcaje Retrógrado en la Amígdala Palial tras Inyecciones de Trazadores en el Estriado Ventral.....	78
<b>Figura 19:</b> Inyecciones de Trazadores en el Caudado-Putamen.....	81
<b>Figura 20:</b> Marcaje Retrógrado en la Amígdala Palial tras Inyecciones de Trazadores en el Caudado-Putamen.....	83
<b>Figura 21:</b> Marcaje Anterógrado en el Estriado tras Inyecciones de Trazadores en la Amígdala Cortical.....	86
<b>Figura 22:</b> Marcaje Anterógrado en el Estriado Ventral tras Inyecciones de Trazadores en el Núcleo Basal de la Amígdala.....	92

<b>Figura 23:</b> Marcaje Anterógrado en el Estriado Dorsal tras Inyecciones de Trazadores en el Núcleo Basal de la Amígdala.....	93-94
<b>Figura 24:</b> Marcaje Anterógrado en el Estriado Ventral tras Inyecciones de Trazadores en el Núcleo Basal Accesorio y en el Área Amígdalo-Hipocámpica de la Amígdala.....	97
<b>Figura 25:</b> Marcaje Anterógrado en el Estriado Dorsal tras Inyecciones de Trazadores en el Núcleo Basal Accesorio de la Amígdala.....	99
<b>Figura 26:</b> Marcaje Anterógrado en el Estriado Ventral tras Inyecciones de Trazadores en el Núcleo Lateral de la Amígdala.....	101
<b>Figura 27:</b> Marcaje Anterógrado en el Estriado Dorsal tras Inyecciones de Trazadores en el Núcleo Lateral de la Amígdala.....	102
<b>Figura 28:</b> Resumen de las Proyecciones desde la Amígdala Palial al Estriado Ventral en el Ratón.....	105
<b>Figura 29:</b> Resumen de las Proyecciones desde la Amígdala Palial al Estriado Dorsal en el Ratón.....	111
<b>Figura 30:</b> Territorios Paliales y Subpaliales de la Amígdala de Mamíferos.....	125
<b>Figura 31:</b> Territorios Paliales y Subpaliales de la Amígdala de Reptiles.....	127
<b>Figure 32:</b> Territorios Paliales y Subpaliales de la Amígdala de Aves.....	135
<b>Figura 33:</b> Heterogeneidad Funcional según Sawnsón y Petrovich (1998).....	144
<b>Figura 34:</b> La Amígdala como Sistema Funcional.....	146
<b>Figura 35:</b> Evolución de la Amígdala en Tetrápodos.....	159

## Lista De Tablas

<b>Tabla 1:</b> Marca Retrógrada en la Amígdala Palial tras Inyecciones en el Estriado Ventral.....	77
<b>Tabla 2:</b> Marca Retrógrada en la Amígdala Palial tras Inyecciones en el Estriado Dorsal.....	82
<b>Tabla 3:</b> Inyecciones en la Amígdala Palial. Marca Anterógrada en el Núcleo Accumbens.....	85
<b>Tabla 4:</b> Marca Anterógrada en el resto de Compartimentos del Estriado Ventral tras Inyecciones en la Amígdala Palial.....	87
<b>Tabla 5:</b> Marca Anterógrada en el Estriado Dorsal tras Inyecciones en la Amígdala Palial.....	88
<b>Tabla 6:</b> Propuesta de Homologías entre los Núcleos y Áreas Amigdalinas Paliales de Mamíferos, Reptiles y Aves.....	132
<b>Tabla 7:</b> Propuesta de Homologías entre los Núcleos y Áreas Amigdalinas Subpaliales de Mamíferos, Reptiles y Aves.....	141

# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN GENERAL

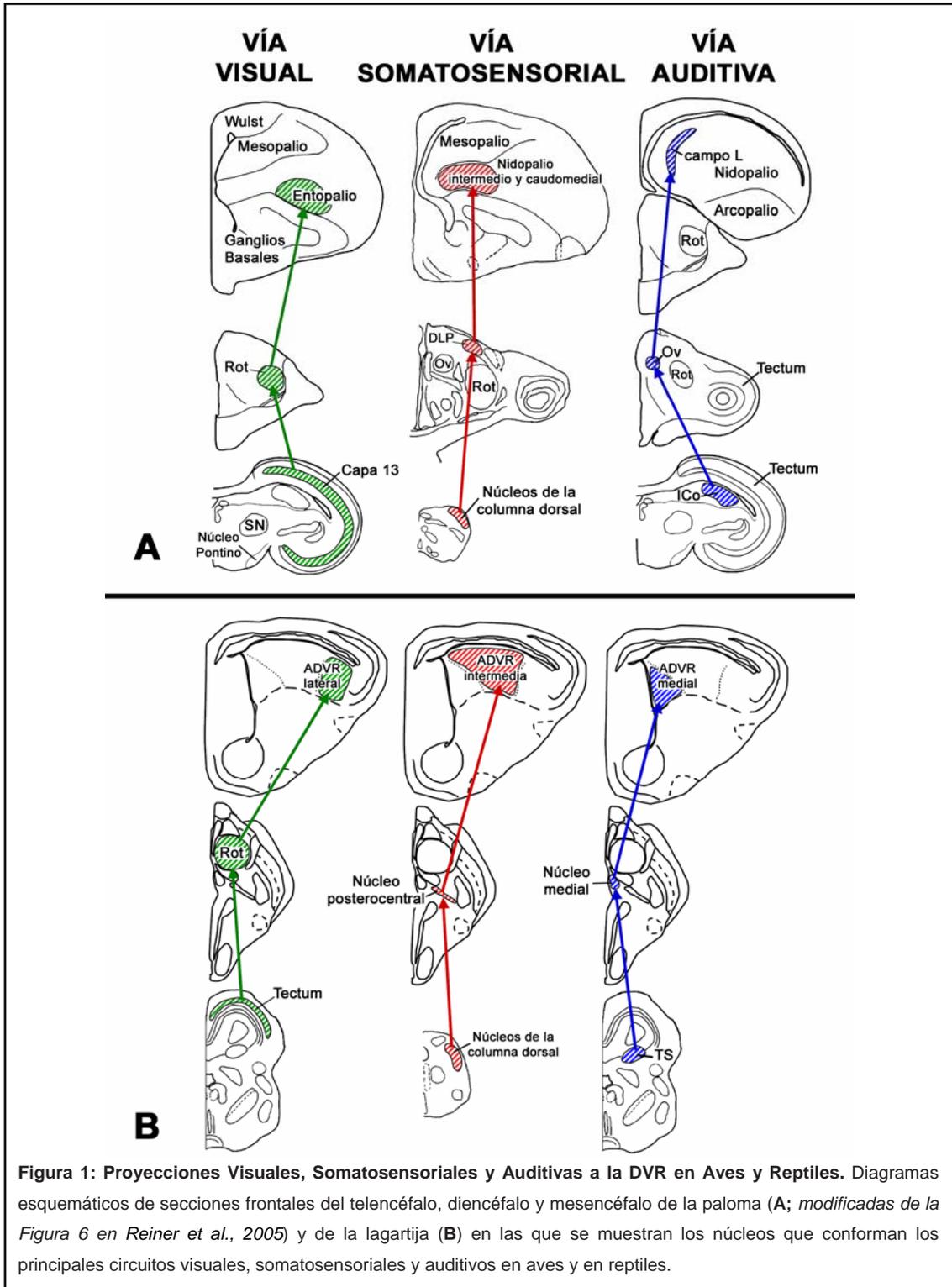
## 1.1 LA NEUROANATOMÍA COMPARADA Y EL ORIGEN DEL NEOCÓRTEX

En el pasado siglo, la neuroanatomía comparada ha estado dominada por un objetivo fundamental, la búsqueda del primordio del neocórtex en el cerebro de los no mamíferos. Ante la ausencia de una estructura semejante arquitectónicamente al neocórtex de los mamíferos en el encéfalo de aves y reptiles, se intentó identificar este primordio del neocórtex usando criterios no arquitectónicos. Este objetivo se vio impulsado por el desarrollo de técnicas fiables de trazado de conexiones, entre los años 1960-70, que dieron lugar a la primera revolución de la neuroanatomía comparada. De entre todas las conexiones del neocórtex, aquella que centró la atención de los neuroanatomistas de la época fue la existencia de aferencias desde el tálamo dorsal, entre las cuales destacan las que derivan de centros sensoriales y definen las áreas corticales sensoriales primarias.

Los resultados de estos estudios indicaron la existencia de centros sensoriales primarios en el palio de reptiles y aves. De hecho, se describió de inmediato una vía visual retino-tálamo-telencefálica que acababa en una zona concreta del palio dorsal, el hiperestriado accesorio (ahora renombrado como hiperpalio apical) o Wulst de las aves (Karten et al., 1973), así como una vía similar que acababa en el córtex dorsal de tortugas (Hall et al., 1977) y en el engrosamiento palial de lagartos (Bruce y Butler, 1984a; Kenigfest et al., 1997).

No obstante, el grueso de las proyecciones ascendentes desde los relevos sensoriales del tálamo acaba en una zona subventricular pero de naturaleza palial que fue nombrada por J.B. Johnston (1923) en reptiles como cresta dorsal ventricular o DVR (del inglés *dorsal ventricular ridge*; ver la excelente revisión clásica de Ulinski, 1983) (ver Fig. 1). Así, tanto en aves como en reptiles, un territorio de la DVR es el blanco de la proyección visual retino-tecto-tálamo-telencefálica, que usa el núcleo rotundo como relevo talámico. En todos los reptiles estudiados esta proyección acaba en la porción lateral de la DVR anterior (Pritz, 1975; Lohman y Van Woerden Verkley, 1978; Balaban y Ulinski, 1981; Bruce y Butler, 1984b; Guirado et al., 2000), mientras que en aves lo hace en una región de la DVR conocida como ectoestriado (Benowitz y Karten 1976, Gamlin y Cohen, 1986), recientemente renombrada como entopalio (Reiner et al., 2004; Jarvis et al., 2005).

Por su parte, las proyecciones somatosensoriales proyectan a una zona de la DVR anterior que no se solapa con la visual. En reptiles se trata de una zona intermedia (en el eje medio-lateral) de la DVR anterior (Lohman y Van Woerden Verkley, 1978; Bruce y Bulter, 1984b; Pritz y Stritzel, 1994), mientras que en aves la proyección ascendente desde el relevo somatosensorial del tálamo



dorsal (núcleo dorsolateral posterior talámico) acaba en partes del nidopalio (antes neostriado) intermedio y caudomedial (Dubbedam et al., 1981; Wild, 1987; Funke, 1989). Por último, el relevo auditivo del tálamo de los reptiles (núcleo medial anterior o reuniens según el grupo) proyecta a la DVR anterior medial (Pritz, 1974a; 1974b; Foster y Hall, 1978) mientras que el de aves el núcleo ovoide u *ovoidalis* del tálamo proyecta a la porción más medial del nidopalio caudal, que se conoce con el nombre de campo L (Karten, 1967; 1968; Wild et al., 1993).

Este cúmulo de datos fue interpretado de diferente manera por distintos autores. Mientras algunos, Philip Ulinski entre ellos (1983), adoptaban una postura cauta y, simplemente, sugerían una analogía entre las áreas sensoriales de la DVR de saurósidos y las áreas sensoriales del isocórtex de los mamíferos, otros autores, encabezados por Harvey Karten sugerían una auténtica homología entre la DVR y el neocórtex. En esta línea, Karten (1991) comparó detalladamente los circuitos auditivos del prosencéfalo de las aves y los mamíferos (Fig. 2).

Esta comparación llevó a Karten y Shimizu (Karten y Shimizu, 1989) a sugerir que existía una homología entre capas del neocórtex y regiones de la DVR y que la laminación y la adquisición de conexiones fueron dos fenómenos que ocurrieron independientemente en la evolución del prosencéfalo de los tetrápodos. Así, las áreas receptoras de las proyecciones del tálamo de la DVR de las aves (y supuestamente de los reptiles) serían homólogas de la capa IV del isocórtex de mamíferos, mientras que las capas II-III del neocórtex, fundamentalmente implicadas en conexiones cortico-corticales serían equivalentes a determinadas áreas de la DVR, llamémoslas intermedias, de las aves que reciben proyecciones de las sensoriales primarias y proyectan a otras áreas del telencéfalo palial (ver Fig. 2). Por último, y dado que en las aves partes del arcopalio (antes conocido como arquiistriado) originan importantes proyecciones extratelencefálicas y reciben proyecciones de estas 'áreas intermedias' de la DVR, Karten compara estas partes del arcopalio con las capas infragranulares del neocórtex de los mamíferos (V y VI).

Una dificultad muy patente de la hipótesis de homología DVR-neocórtex es la derivada de las grandes diferencias arquitectónicas y la distinta posición relativa que

ambas estructuras adultas (topografía) y sus primordios embrionarios (topología) ocupan en los hemisferios cerebrales de saurópsidos y mamíferos.

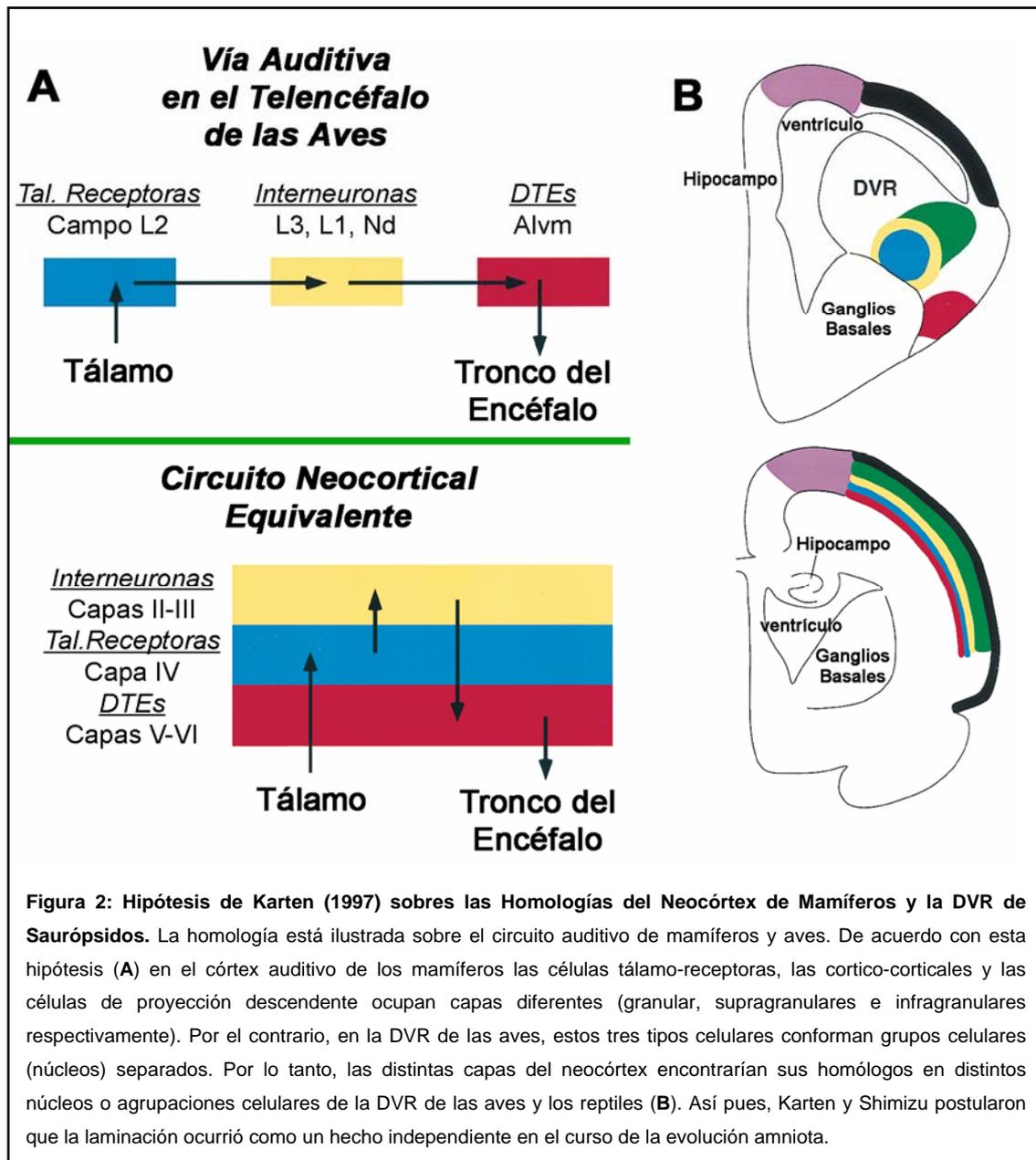


Figura 2: Hipótesis de Karten (1997) sobre las Homologías del Neocórtex de Mamíferos y la DVR de Saurópsidos. La homología está ilustrada sobre el circuito auditivo de mamíferos y aves. De acuerdo con esta hipótesis (A) en el córtex auditivo de los mamíferos las células tálamo-receptoras, las cortico-corticales y las células de proyección descendente ocupan capas diferentes (granular, supragranulares e infragranulares respectivamente). Por el contrario, en la DVR de las aves, estos tres tipos celulares conforman grupos celulares (núcleos) separados. Por lo tanto, las distintas capas del neocórtex encontrarían sus homólogos en distintos núcleos o agrupaciones celulares de la DVR de las aves y los reptiles (B). Así pues, Karten y Shimizu postularon que la laminación ocurrió como un hecho independiente en el curso de la evolución amniota.

Para explicar estas diferencias entre estructuras supuestamente homólogas, Karten (1991) recurrió a una explicación algo artificiosa, según la cual las distintas capas del isocórtex de los mamíferos se originarían mediante sucesivas oleadas de migración de neuronas nacientes originadas unas del neuroepitelio palial (migración radial) y otras del

epitelio 'subventricular' (migración tangencial desde el primordio de la DVR). Aunque esta hipótesis se basa en datos anatómicos de la época que indicaban la existencia de migraciones tangenciales masivas hacia el córtex durante el desarrollo (Kuan et al., 1997), años después se demostró que las células migradas tangencialmente se originan en la eminencia ganglionar medial subpalial y originan células GABAérgicas que se distribuyen por todas las capas del neocórtex (ver Marín y Rubenstein, 2003; Pla et al., 2006), lo que desacredita bastante la hipótesis de Karten.

Sin embargo, la obsesión por encontrar el neocórtex primordial sesgó hasta tal punto la interpretación de los resultados que ha dado lugar a una larga lista de publicaciones en las mejores revistas en las que se da por demostrada la existencia de un neocórtex en el telencéfalo de aves. Un ejemplo es el trabajo de Divac y sus colaboradores (Mogensen y Divac, 1982; Divac et al., 1985; Divac y Mogensen, 1985; 1993) quienes sugirieron que una zona de la DVR posterolateral de las aves (la llamada área temporo-parieto occipital, TPO) era homóloga al córtex prefrontal de los mamíferos, basándose en el hecho de que ambas estructuras comparten una densa inervación dopaminérgica y participan en la elaboración de respuestas apetitivas ejecutadas con alternancia retardada (*delayed alternation*). Esta idea goza de amplia aceptación como lo demuestra el hecho de que la búsqueda '*cortex prefrontal birds*' en el *Pubmed* dé 48 resultados. Entre los seguidores de esta idea destaca el grupo de Onur Güntürkün, quien ha realizado detallados estudios histoquímicos y de conexiones de la DVR caudo-lateral de las aves, así como minuciosos análisis del efecto de lesiones o inactivaciones de esta área en el comportamiento de las aves, bajo la premisa de que constituye el córtex prefrontal aviar.

El mayor problema de esta hipótesis no es su posible inconsistencia sino que se haya generado basándose tan solo en las posibles similitudes entre el cerebro de aves y el de los mamíferos. Cualquier propuesta de homologías debe incluir un análisis cladístico de caracteres anatómicos que incluya en el estudio de los mismos no sólo las aves y los mamíferos sino también los distintos grupos de reptiles (al menos *Squamata*, tortugas y cocodrilos). En este sentido, los estudios de la porción posterolateral de la DVR de reptiles contradicen la hipótesis de homología de la DVR con el neocórtex. Por el contrario, estos estudios sugieren que esta zona, la DVR caudal de los reptiles, constituye una porción de su amígdala (Bruce y Neary, 1995a; 1995b; Lanuza et al., 1997; 1998; Guirado et al., 2000; Martínez-García et al., 2002a), en plena congruencia con los

estudios clásicos de J.B. Johnston (1923) y Alice Osborn Curwen (1939). Así pues, el estudio del polo caudal de la DVR de reptiles y de aves ha dado lugar a dos propuestas diferentes y contradictorias acerca de su homología con el cerebro de mamíferos. Uno de los objetivos de esta tesis es contribuir a aclarar este punto. Con ello pretendemos, igualmente, aumentar nuestra comprensión de la evolución del cerebro de los vertebrados estudiando desde una perspectiva comparada la anatomía de centros cerebrales no neocorticales, como la amígdala y el estriado.

## **1.2 ENTENDER EL TELENCEFALO: EL CIRCUITO BÁSICO DEL PALIO Y EL SUBPALIO**

En nuestro estudio comparado partimos de la hipótesis propuesta por Swanson y Risold (1999) acerca de la organización de los hemisferios cerebrales y las reglas que los gobiernan. En este sentido, la principal división del telencéfalo es la que contempla el palio y el subpalio. El palio es el parénquima nervioso topológicamente dorsal a los ventrículos laterales, la mayor parte del cual se encuentra organizado en estructuras laminares conocidas con el nombre de córtex cerebral. El subpalio se origina de los neuroepitelios basales (ventrales) de ambos hemisferios cerebrales y, con pocas excepciones, no presenta organización laminar sino nuclear. En los primeros estadios de desarrollo embrionario, las estructuras subpaliales forman dos engrosamientos que se conocen con el nombre de eminencias ganglionares medial y lateral (algunos autores añaden una tercera eminencia ganglionar caudal). Los principales derivados adultos de estas eminencias ganglionares son las estructuras estriatales (caudado-putamen) y palidales (*pallidum*).

La relevancia de esta división no fue comprendida cabalmente hasta que en 1975 dos grupos observaron, por separado, que el núcleo accumbens y el tubérculo olfativo presentaban un patrón de conexiones con el tegmento mesencefálico que recordaba al del caudado-putamen (Heimer y Wilson, 1975; Swanson y Cowan, 1975). Estos hallazgos llevaron a Heimer y Wilson (1975) a sugerir que el núcleo accumbens, el tubérculo olfativo y el *fundus striatum* (una pequeña porción latero-basal del caudado-putamen) constituían simplemente la porción ventral del estriado, del que el caudado-putamen era la parte dorsal. Estudios más recientes han revelado más similitudes entre las porciones dorsal y ventral del estriado, relativas a su organización intrínseca, sus conexiones

extrínsecas y sus propiedades neuroquímicas. El patrón de organización compartido por todas las estructuras estriatales incluye el *input* glutamatérgico masivo desde áreas del córtex (arquicórtex-hipocampo para el estriado ventral, isocórtex para el dorsal), así como eferencias directas e indirectas (a través del pálido ventral y del globo pálido) a centros tegmentales (área ventral tegmental y *substantia nigra*), que se originan en células GABAérgicas (y peptidérgicas) estrelladas y espinosas de tamaño medio. Por su parte, los blancos tegmentales del estriado dan lugar a proyecciones dopaminérgicas de vuelta a las áreas estriatales de las que reciben proyección (Figura 3).

Estudios más recientes han revisado y ampliado este esquema. Así, Swanson y Risold (1999), tras estudiar muy detalladamente las conexiones y propiedades neuroquímicas del septum lateral, lo han reinterpretado como una porción del estriado a la que llaman estriado medial, siguiendo la sugerencia de Santiago Ramón y Cajal (1901). Como el estriado propiamente dicho, el septum lateral recibe una densa proyección glutamatérgica desde una porción del córtex (la formación hipocámpica). Además el septum lateral posee células estrelladas espinosas de tamaño mediano que originan una proyección GABAérgica al pálido, concretamente al septum medial y núcleo de la banda diagonal, que constituirían por tanto el pálido medial, así como al núcleo tegmental del que recibe su aferencia dopaminérgica, el área ventral tegmental. Este esquema, fue aun más detallado por Lanuza et al (2002) quienes observaron además, que es aplicable a los hemisferios cerebrales de todos los vertebrados amniotas. Como indica la Figura 3, la vía cortico-estriado-palidal (incluyendo el bucle estriado-tegmental) parece ser el circuito básico de los hemisferios cerebrales. Además de las propiedades hodológicas y neuroquímicas mencionadas, este circuito se caracteriza por la presencia de aferencias talámicas al palio y de importantes conexiones cortico-corticales, que incluyen algunas conexiones comisurales simétricas y asimétricas. Algunas áreas corticales originan también vías descendentes extratelencefálicas que acaban en el tálamo, hipotálamo, puente, tegmento y/o tronco cerebral, saltándose el complejo estriado-palidal.



Otra característica del palio es que las neuronas de proyección, las neuronas piramidales, son glutamatérgicas y por lo tanto lo son sus proyecciones extrínsecas e intrínsecas (cortico-corticales). Pero además, el palio posee una población minoritaria pero importante de interneuronas GABAérgicas y peptidérgicas. Por el contrario en el estriado coexisten neuronas de proyección GABAérgicas/peptidérgicas con una importante población de interneuronas colinérgicas. Por último, en el pálido existe una población dispersa de neuronas colinérgicas (y algunas GABAérgicas; Kohler et al., 1984;

Zaborszky et al., 1999; Sarter y Bruno, 2002) que originan una proyección ascendente de vuelta al córtex.

A la vista de este esquema resulta dudosa la utilidad, en estudios comparados, de caracteres generales del palio, como la presencia de aferencias talámicas o de proyecciones al estriado, para definir una de sus porciones (el neocórtex) en el encéfalo de no mamíferos. El significado comparado de una determinada zona del palio tendrá que deducirse del de las estructuras estriatales a las que proyecta y de las talámicas de las que recibe aferencias, así como de la existencia o no de proyecciones directas a porciones del tálamo, hipotálamo o tronco cerebral, y de las conexiones palio-paliales y comisurales que muestre.

### **1.3 LA TOPOLOGÍA Y LA EXPRESIÓN DE LOS GENES HOMEÓTICOS DURANTE EL DESARROLLO**

La organización del telencéfalo en compartimentos palial, estriatal y palidal conectados de acuerdo con el esquema descrito y con las características neuroquímicas mencionadas es el resultado del desarrollo embrionario temprano de los hemisferios cerebrales. Como en otras partes del cuerpo, en el encéfalo y más concretamente en el telencéfalo, la expresión de una serie de genes morfogenéticos (mayoritariamente genes homeóticos, que codifican homeodominios que se unen al DNA actuando como factores de transcripción) determina las coordenadas posicionales de sus diferentes partes y divisiones, y con ello la naturaleza palial, estriatal o palidal de las distintas porciones del neuroepitelio así como los ejes medio-lateral y antero-posterior del palio. El estudio de estos genes y de sus patrones de expresión ha aportado, por ello, información de un valor inestimable para la comprensión de la organización del telencéfalo y del significado comparado de sus partes.

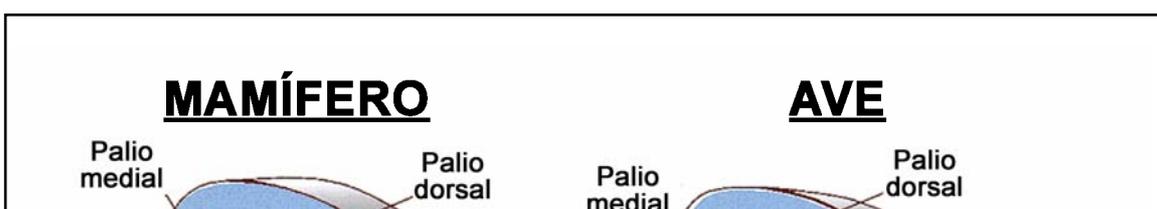
Dado su papel clave en el desarrollo, los genes homeóticos han sufrido una evolución muy conservadora, hasta el punto de que genes homólogos determinan la identidad del ojo en vertebrados y moluscos (Pax-6) y en insectos (eyeless). De hecho, la inducción artificial de la expresión del gen Pax-6 de un calamar en una posición anómala de un embrión de *Drosophila* provoca el desarrollo de un ojo compuesto ectópico (Tomarev et al., 1997). Así pues, el estudio de la expresión de genes homeóticos durante

el desarrollo constituye una herramienta muy útil para marcar territorios homólogos (con la misma identidad y coordenadas posicionales) en distintos vertebrados.

Utilizando esta estrategia Smith-Fernández et al. (1998) demostraron que en el embrión del ratón existía un territorio telencefálico que no expresaba los genes marcadores del palio (*emx-1*) ni del subpalio (*Dlx-1*), al que denominaron zona intermedia. En los embriones de no mamíferos estudiados (pollos y tortugas) el territorio telencefálico que cumplía estos requisitos coincidía con la DVR. En el ratón, el derivado adulto del territorio intermedio incluía parte del paleocórtex y del complejo amigdalino, lo que llevo a Smith-Fernández et al. (1998) a sugerir una homología entre la DVR posterior de los saurópsidos y partes de la amígdala de los mamíferos.

Al mismo tiempo que Smith-Fernández y sus colaboradores, los grupos de Puelles y Rubenstein llevaron a cabo un estudio similar en embriones de ratón y de pollo, si bien el análisis anatómico de sus preparaciones era mucho más preciso y minucioso, e incluía también el patrón de expresión de otros genes paliales, concretamente *Tbr-1* y *Pax-6*, y del gen subpalial *Nkx-2.1* (Puelles et al. 1999; 2000). Los resultados de su trabajo indicaban que la 'zona intermedia' de Smith-Fernández y colaboradores era, en realidad, una porción del palio más lateral que el palio lateral (paleocórtex) al que ellos bautizaron con el nombre de palio ventral.

Como se indica en la Figura 4, los resultados de Puelles y colaboradores (2000) sugerían además que en las aves, del palio ventral embrionario se derivaban el entopalio y nidopalio adultos así como la porción intermedia ventral del arquiestriado, mientras que el palio lateral embrionario daba lugar no sólo al córtex piriforme sino también al hipopalio ventral y a las divisiones posterior e intermedia dorsal del arquiestriado. Por su parte, en mamíferos, el palio lateral daba lugar al córtex piriforme y a la parte más dorsal del complejo claustró-endopiriforme, así como a las porciones topológicamente más dorsales de la amígdala cortical y al núcleo basal de la amígdala. Por último, el palio ventral de los mamíferos daba lugar a las porciones ventrales del complejo claustró-amigdalino, que incluiría el núcleo endopiriforme ventral, las porciones topológicamente más ventrales de la amígdala cortical, incluido el núcleo del tracto olfativo lateral, así como los núcleos lateral y basal accesorio de la amígdala.



## **1.4 LOS NUEVOS DATOS APOYAN LAS VIEJAS IDEAS: IDENTIDAD DE LA AMÍGDALA DE LOS REPTILES**

Uno de las consecuencias de la publicación de los resultados de la expresión de genes homeóticos durante el desarrollo embrionario es que cuestionaron muy seriamente la hipótesis dominante de la neuroanatomía comparada, la posible homología de la DVR con al menos algunas capas del neocórtex de los mamíferos. No obstante, aunque esta hipótesis parecía ser aceptada por un gran número de neuroanatomistas comparados (lo que podríamos denominar la escuela Estadounidense y algunos anatomistas europeos), antes de la aparición de datos de expresión génica ya se habían oído voces que, utilizando datos de conexiones y topología, planteaban serias dudas acerca de la validez de esta hipótesis.

Así, la hipótesis se basa en la consideración de que las zonas sensoriales del tálamo dorsal de aves y reptiles que proyectan a la DVR son homólogas de las que originan las proyecciones a las áreas sensoriales primarias del neocórtex de los mamíferos, si bien esto no se ha demostrado y existen serias dudas al respecto (ver Butler 1994b; Guirado et al., 2000; 2002; Dávila et al., 2002). Por otro lado, otras proyecciones del neocórtex no se encuentran en la DVR. Así, las áreas tálamo-receptoras de la DVR no proyectan de vuelta a los núcleos talámicos de los que reciben aferencias. Del mismo modo, aunque la DVR presenta importantes proyecciones intrínsecas (Andreu et al., 1996; Metzger et al., 1998; Lanuza et al., 1998; Kröner y Güntürkün, 1999) es patente la ausencia completa de proyecciones comisurales en la DVR de reptiles y aves (Ulinski, 1983), mientras que en los mamíferos placentarios las conexiones comisurales del neocórtex conforman uno de los tractos más llamativos, por su tamaño, del encéfalo, el cuerpo caloso. Del mismo modo, la DVR carece de proyecciones directas al techo mesencefálico (muy patentes en las áreas visual y auditiva del neocórtex) y al puente rombencefálico (Ulinski, 1983). Uno de los puntos rara vez discutidos en las revisiones sobre esta cuestión es el porqué se considera que la presencia de las aferencias talámicas es más importante, como criterio de homología, que la ausencia de otras proyecciones.

Pero también había datos positivos que contradecían la hipótesis de la homología neocórtex-DVR, al sugerir otras posibles homologías para el polo caudal de la DVR de los

reptiles. Así, en 1995 Bruce y Neary (1995a; 1995b) trazaron retrógradamente las proyecciones aferentes al hipotálamo del gecko, en el que demostraron que la parte posterior de la DVR (PDVR) originaba una proyección notable al hipotálamo ventromedial similar a la que en los mamíferos constituye el grueso de la *stria terminalis* y que se origina en la amígdala. Estos datos fueron replicados y ampliados en otra especie de lagartos, *Podarcis hispanica* (Font et al., 1995; Lanuza et al., 1997) quienes observaron que la PDVR y un núcleo adyacente al mismo, conocido con el nombre de amígdala lateral, originaban la *stria terminalis* que acababa en diversos núcleos del hipotálamo ventromedial que incluían niveles retroquiasmáticos y tuberoinfundibulares. Además otros núcleos adyacentes (ventral anterior y/o posterior de la amígdala) proyectaban a zonas aun más caudales (premamilares) del hipotálamo. Por el contrario, la llamada transición estriado-amigdalina, para la que se había propuesto una posible homología con la amígdala central (Russchen y Jonker, 1988), proyectaba a núcleos del compartimento lateral del hipotálamo y a estructuras del tronco cerebral. Poco después, Lanuza et al. (1998) estudiaron las conexiones aferentes a la PDVR de *P. hispanica* y demostraron que recibía aferencias talámicas multimodales. Además la PDVR era el blanco de aferencias convergentes desde centros telencefálicos unimodales quimiosensoriales, y de las porciones auditiva, visual y somatosensorial de la DVR anterior, confirmando los resultados de Andreu et al. (1996) en *Psammodromus algirus*. Por otra parte, la PDVR recibía también aferencias de centros rombencefálicos que incluían el área parabraquial, así como aferencias directas desde el córtex hipocámpico. Todos estos datos llevaron a Lanuza et al. (1998) a sugerir que la PDVR y los núcleos adyacentes constituían la amígdala basolateral de los reptiles.

Curiosamente, las conclusiones de estos estudios detallados de la conectividad del telencéfalo de reptiles coincidían plenamente con las derivadas de los trabajos clásicos de J.B. Johnston (1923) y Alice Osborn Curwen (1939), quienes basándose simplemente en estudios de la arquitectura del telencéfalo de los reptiles y de su comparación con el de los mamíferos habían sugerido que el cuadrante ventro-lateral del polo caudal de los hemisferios cerebrales de los reptiles constituía su amígdala. Los datos de Bruce y Neary (1995) y de Lanuza et al. (1997; 1998) indicaban que, como en mamíferos, la amígdala de los reptiles proyectaba masivamente al hipotálamo, y que parte de esta proyección surgía de una zona asociativa del palio equiparable a la amígdala basolateral de los mamíferos.

Estos datos, no obstante, se hacían muy difícil de conciliar con la posible identidad neocortical de la DVR propuesta por la escuela norteamericana de neuroanatomía comparada (Striedter, 1997).

## **1.5 LAS CONEXIONES INTRATELENCEFÁLICAS DE LA AMÍGDALA, LAS GRANDES OLVIDADAS**

Mientras tanto, los estudios en aves seguían apostando por la hipótesis de la naturaleza neocortical de la DVR y de la homología de algunas de sus divisiones con capas concretas del neocórtex de los mamíferos. Así, en 1995 Veenman et al., estudiaron las proyecciones de la DVR al estriado de la paloma en un artículo en el que asumían su naturaleza cortico-estriatal. En él, los autores interpretaban las proyecciones a los distintos compartimentos estriatales como parte del circuito neocortical y atribuían a la DVR caudal una naturaleza prefrontal siguiendo la idea propuesta por Mogensen y Divac (Mogensen y Divac, 1982; Divac et al., 1985; Divac y Mogensen, 1985; 1993).

Por su parte, los datos en reptiles, en donde la naturaleza amigdalina de la PDVR no es cuestionada, son incompletos y parcialmente contradictorios. Así, Martínez-García et al. (1993) habían realizado algunas inyecciones de peroxidasa de rábano en la DVR caudal de *Podarcis* y observaron un denso marcaje anterógrado en las zonas dorsal y ventral (núcleo accumbens) del estriado, mientras que González et al. (1990) analizaron detalladamente las conexiones del estriado y del núcleo accumbens del gecko (*Gekko gecko*) usando trazado retrógrado y anterógrado sin que apenas describieran conexiones con el polo caudal de la DVR. Por último, los estudios en serpientes también indicaban la existencia de proyecciones masivas al estriado ventral desde el polo caudal del DVR (Lanuza y Halpern, 1997; Pérez-Santana et al., 1997), si bien se trataba de descripciones poco detalladas, excepto en lo tocante a las originadas en el núcleo esférico.

Este desinterés relativo acerca de las conexiones amígdalo-estriatales en no mamíferos se explica, en gran medida, por el hecho de que, si bien se conoce la existencia de proyecciones desde la amígdala al estriado en mamíferos, suelen ser ignoradas en las visiones funcionales de la anatomía amigdalina en favor de otras proyecciones eferentes de la amígdala cuyo papel en el control del comportamiento es más claro. Un ejemplo paradigmático de este descuido es el análisis de la anatomía funcional de la amígdala

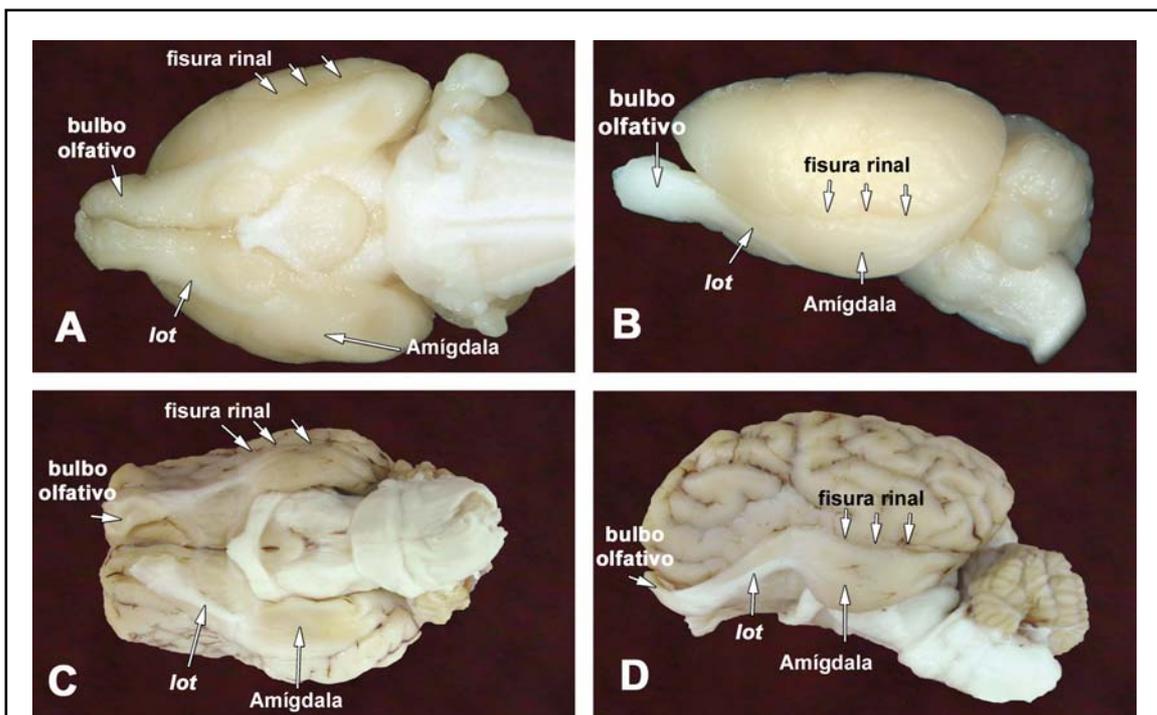
realizado por Pitkänen et al. (1997) quienes, tras revisar los datos publicados hasta fecha sobre las conexiones de la amígdala, los interpretaron en el contexto de la expresión del miedo y el miedo condicionado para concluir que la amígdala ejerce su importante función en el control del comportamiento a través de las eferencias de la amígdala central sobre el hipotálamo y el tronco del encéfalo.

No obstante, los mamíferos muestran importantes proyecciones amígdalo-estriatales, como se ha puesto en evidencia usando distintas técnicas de trazado (aminoácidos tritiados, peroxidasa y lectinas) en diferentes especies incluidas la rata, el gato y el macaco (Krettek y Price, 1978; Kelley et al., 1982; Wright et al., 1996; Fudge et al., 2002). Por otro lado, el grupo de Everitt y Robbins demostró que las lesiones de la vía amígdalo-accumbens en la rata afectaban seriamente a su capacidad de generar respuestas apetitivas frente a reforzantes secundarios (Cador et al., 1989; Everitt et al., 1989). La enorme complejidad del estudio del refuerzo quizás explique porqué el miedo, más asequible al análisis experimental, ha recibido más atención. Desgraciadamente, esto ha sesgado las ideas de la comunidad científica acerca de la función de la amígdala y de sus proyecciones y, como consecuencia, las conexiones amígdalo-estriatales han recibido menos atención que otras, también en los estudios comparados. Uno de los objetivos de esta tesis es cubrir esta laguna en la neuroanatomía comparada del telencéfalo.

## **1.6 LA AMÍGDALA: ¿UNIDAD FUNCIONAL O ARTIFICIO?**

El nombre amígdala, derivado del término greco-latino *amygdala*, almendra, fue acuñado por Burdach (citado por Swanson y Petrovich, 1998) para designar una pequeña protuberancia con tamaño y forma de una almendra, situada en lo más profundo del lóbulo temporal del cerebro humano. La amígdala es fácil de identificar macroscópicamente en el encéfalo de muchos mamíferos como un pequeño bulto liso situado en la base de los hemisferios cerebrales caudales (ver Figura 5). Tanto en mamíferos lisencéfalos como en girencéfalos la amígdala es ventral a la fisura rinal y se sitúa al final del tracto olfativo lateral, lo que de hecho refleja la naturaleza olfativa y vomeronasal de algunas de las estructuras que la componen.

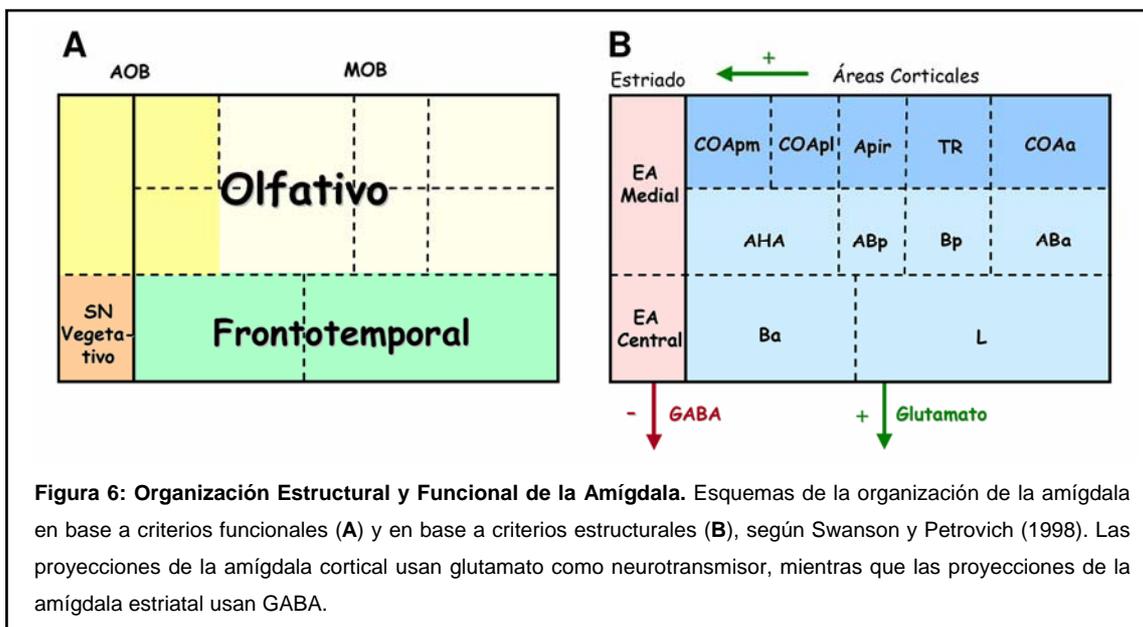
Un análisis pormenorizado de la amígdala de los mamíferos revela, sin embargo, que se trata de una estructura anatómicamente muy compleja, cuya función no es únicamente quimiosensorial. Desde el punto de vista anatómico ya J.B. Johnston (1923), en el primer análisis comparado de la amígdala de los vertebrados, propuso que se trataba de una mezcla de estructuras paliales (divisiones basolateral y cortical) y subpaliales (amígdala central y medial). Tanto los estudios de marcadores de territorios paliales y subpaliales en el adulto (ver apartado 1.2 de esta Introducción) como los de la expresión de genes homeóticos marcadores de estos territorios durante el desarrollo embrionario (ver apartado 1.3) han confirmado la heterogeneidad anatómica de la formación amigdalina. De hecho, en un revisión sagaz y provocativa, Swanson y Petrovich (1998) propusieron que la amígdala era un nombre con el que se designaba a una agrupación arbitraria de estructuras paliales pertenecientes al córtex olfativo o paleocórtex y al claustró ventromedial y a otras estructuras subpaliales pertenecientes al estriado (Figura 6A).



**Figura 5: Anatomía Macroscópica de la Amígdala de Mamíferos.** La amígdala se identifica fácilmente en el cerebro de mamíferos, tanto lisencefálicos (e.g. la rata; **A**, visión ventral; **B**, visión lateral) como girencefálicos (e.g. el cordero; **C**, visión ventral; **D**, visión lateral). En ambos casos, el tracto olfativo lateral puede seguirse desde los bulbos olfativos hasta el abultamiento basal en los hemisferios cerebrales caudales que corresponde a la amígdala.

En concordancia con esta idea, Puelles et al. (2000) sugieren abandonar el término ‘amígdala’ y emplear en su lugar expresiones ‘neutras’ como lateropalial (perteneciente al palio lateral), ventropalial (perteneciente al palio ventral), estriatal o palidal.

Swanson y Petrovich (1998) sostienen que a esta heterogeneidad anatómica hay que añadir una heterogeneidad funcional. Así, la amígdala sería una suma de centros nerviosos pertenecientes a los sistemas olfativo-vomeronasal, autonómico y al llamado sistema fronto-temporal, constituido por la división basolateral de la amígdala y amplias porciones del córtex (pre)frontal y temporal (Figura 6B). Estas consideraciones llevan a Swanson y Petrovich a plantear que nombres como el de ‘amígdala’ (y como otros heredados de la tradición neuroanatómica) designan grupos celulares combinados arbitrariamente, en lugar de en función de las unidades estructurales y funcionales a las que parecen pertenecer. Concluyen, por tanto, que la amígdala no constituye ni una unidad estructural ni una unidad funcional.



Hay que tener presente, que esta conclusión (ciertamente radical) se basa en el análisis de la anatomía funcional de la amígdala de una sola especie, la rata y que para que estas conclusiones puedan ser sólidas deben ser aplicables a todas las especies de vertebrados tetrápodos. En este sentido, los estudios neuroanatómicos comparados discutidos arriba indican que no existe un neocórtex en los reptiles. Por lo tanto, la unidad funcional que Swanson y Petrovich denominan Fronto-temporal o no existe en

los reptiles o esta constituida únicamente por la división basolateral de la amígdala. Si esta división estuviera conectada con otros centros de la amígdala, las diferentes divisiones funcionales consideradas por Swanson y Petrovich (1998) serían, a su vez, funcionalmente interdependientes, lo que transformaría la amígdala en un sistema funcional de orden superior.

Así pues, estudiar las conexiones de ésta porción del encéfalo de los reptiles puede no sólo ayudar a entender su significado comparado y su posible homología en el cerebro de los mamíferos y de otros tetrápodos, sino contribuir a entender la función de la amígdala y la posible incardinación de sus diferentes componentes en uno o diversos sistemas funcionales.

# **Capítulo 2**

## **OBJETIVOS**

## OBJETIVOS DE LA TESIS

El objetivo general de esta tesis es realizar un estudio comparado de las conexiones intratelencefálicas de la amígdala, más específicamente de sus conexiones con el estriado. Para ello utilizaremos dos especies, un representante de los reptiles, la lagartija común *Podarcis hispanica*, y un modelo de mamífero cada vez más empleado en investigaciones de la función cerebral pero para el que hay pocos datos anatómicos, el ratón *Mus musculus*.

De este objetivo general se derivan los siguientes objetivos secundarios:

1. Realizar una propuesta detallada de las homologías entre las distintas divisiones de la amígdala de reptiles y mamíferos.
2. A la luz de estos datos, revisar las ideas acerca del significado comparado de las distintas áreas de los hemisferios cerebrales de las aves.
3. Entender la evolución de la amígdala en los tetrápodos y la influencia que, en la estructura de la misma, puede haber tenido el mayor o menor grado de desarrollo de los sistemas quimiosensoriales.
4. Elaborar un esquema de la anatomía funcional de la amígdala de los vertebrados, basada en un estudio comparado exhaustivo, que permita abordar adecuadamente la cuestión de si la amígdala constituye una unidad funcional o si, por el contrario, es un término arbitrario sin entidad conceptual que debe ser abandonado.
5. Entender el papel que la amígdala ha jugado en la evolución de los hemisferios cerebrales de los tetrápodos.

# Capítulo 3

## MATERIAL Y MÉTODOS



### 3.1 ANIMALES

En la primera parte del estudio se utilizaron 42 especímenes adultos (de ambos sexos) de *Podarcis hispanica* (48-54 mm de longitud hocico-cloaca). Los animales se capturaron en València, España, entre 1988 y 1998 bajo una licencia expedida por la *Conselleria d'Agricultura i Medi Ambient* del Gobierno Valenciano, se mantuvieron en un terrario con agua *ad libitum* y se alimentaron dos veces por semana con larvas de *Tenebrio molitor*, bajo un ciclo natural día/noche, a 20-25°C. En la segunda mitad del trabajo experimental se utilizaron 39 hembras adultas de ratón *Mus musculus* de la cepa C57BL/J6 (17'9g - 25'1g de peso corporal; Harlan Interfauna Ibèrica S.L., Barcelona, España). Los animales se estabularon en jaulas con comida y agua *ad libitum*, bajo un ciclo natural día/noche, a 22-25°C.

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las pautas del Consejo de Comunidades Europeas (86/609/EEC) para el manejo de animales experimentales.

### 3.2 EXPERIMENTOS DE TRAZADO DE CONEXIONES

Con el objetivo de identificar en ambas especies las células de origen de las proyecciones desde la amígdala palial al prosencéfalo basal, inyectamos trazadores neuroanatómicos por ionoforesis en diferentes partes del estriado, tanto en lagartijas como en ratones y analizamos el marcaje retrógrado resultante. En el caso de *Podarcis hispanica* se llevaron a cabo 7 inyecciones en el estriado, (n=4, estriado ventral; n=3, estriado dorsal). Del mismo modo, en *Mus musculus* realizamos inyecciones en diferentes partes del núcleo accumbens (n=4, área periférica [*shell*] medial del accumbens; n=1, área periférica [*shell*] lateral del acumbens; n=5, área central [*core*] del accumbens; n=2, inyecciones no restringidas) y del caudado-putamen (n=7) y en el islote de Calleja Magno (n=1).

Una vez identificadas en ambas especies las células de origen de las proyecciones amígdalo-estriatales se procedió a la inyección de trazadores en los diferentes núcleos de la formación amigdalina para analizar el marcaje anterógrado resultante en el telencéfalo basal. En *Podarcis hispanica* realizamos 19 inyecciones en diferentes áreas de la formación amigdalina (n= 8, PDVR; n=6, núcleo dorsolateral amigdalino; n=1, córtex lateral profundo; n=4, núcleo esférico), y en *Mus musculus* las inyecciones se llevaron a cabo en

los diferentes núcleos de la amígdala palial (amígdala cortical n=3; amígdala profunda n=10). Además, aparte de los resultados propios obtenidos en *Podarcis hispanica*, la descripción de los resultados en esta especie se apoyó en casos ya publicados y en casos pertenecientes al archivo de nuestro laboratorio.

Como control, en ambas especies se realizaron inyecciones adicionales en diferentes áreas vecinas a la amígdala y al telencéfalo basal (En *Podarcis hispanica* [n= 4, ADVR; n=8, corteza dorsal; n= 3, corteza lateral; n= 6, septum,]; En *Mus musculus* [n=2, LGP; n=5, AStr; n=1, subículo]).

En este trabajo, se han utilizado cuatro trazadores diferentes: peroxidasa de rábano (HRP; Tipo VI; Sigma, St. Louis, MO), leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L; Vector Laboratories, Burlingame, CA), dextran-amina biotilada (BDA, peso molecular 10.000 y 3.000, BDA-10.000 y BDA-3.000; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) y dextran-amina marcada con tetrametilrodamina (RDA, peso molecular 10.000; fluoro-ruby; Molecular Probes, Eugene, OR, USA). En los ratones únicamente se utilizaron como trazadores la BDA y la RDA. Tal y como se ha demostrado previamente, con nuestros protocolos y en nuestras condiciones experimentales, los cuatro trazadores dan marcaje anterógrado y retrógrado de forma consistente (Lanuza et al., 1997; 1998; Martínez-Marcos et al., 1999b; resultados del presente trabajo; ver más adelante).

Para minimizar el número de animales, cada sujeto recibía dos inyecciones de trazadores, de modo que a cada inyección se le asignaba un código que consistía en una letra indicativa del trazador (H para la peroxidasa, P para la PHA-L, B para la BDA y R para la RDA) seguida de un número de cuatro dígitos que hacía referencia al espécimen.

Para la cirugía, las lagartijas se preanestesiaron con halotano (2-brom-2-clor-1,1,1-trifluoretano, 99%; Aldrich, Steinheim, Alemania), tras lo cual fueron anestesiadas profundamente con una inyección intramuscular de 6'5 µl por gramo de peso corporal de Ketolar (Clorhidrato de Ketamina 50 mg/ml, Parke-Davis, El Prat de Llobregat, España). Por su parte, los ratones se anestesiaron profundamente mediante una inyección intraperitoneal de 6'5 µl por gramo de peso corporal de pentobarbital sódico (11 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), siguiendo en protocolo de Shipley y Adamek (1984).

Tras la anestesia, los animales se colocaron en un aparato estereotáxico (Stoelting, Wood Lane, IL, USA, en el caso de las lagartijas con un adaptador para aves) y tras una pequeña incisión en la piel (en el caso de los ratones), se trepanó el cráneo para acceder al área deseada. Los trazadores se inyectaron por ionoforesis desde soluciones de los mismos a las concentraciones adecuadas (HRP al 10% en tampón Tris [TB] 0'05M, pH 8'6; PHA-L al 2'5% en tampón fosfato [PB] 0'01M, pH 7'4; BDA al 5-10% en PB 0'01M, pH 7'6; RDA al 5-10% en PB 0'01M, pH 7'6) a través de micropipetas de vidrio con una punta de diámetro interno de 10-40  $\mu\text{m}$ . Para ello, aplicamos pulsos de corriente positiva (7 segundos *on/off*; 3  $\mu\text{A}$ ) a través de la solución del trazador, durante 5-15 minutos con un generador de corriente (Midgard Precision Current Source, Stoelting). La pipeta se dejó en el mismo lugar durante 5 minutos tras la inyección para evitar el reflujo. Además, durante la entrada y la salida de la micropipeta, se aplicó una corriente continua de retención de baja intensidad (-0'9  $\mu\text{A}$ ) para evitar la difusión del trazador a lo largo del recorrido de la pipeta.

En el caso de las lagartijas, las inyecciones se llevaron a cabo tomando el vértice anterior de la escama pineal como punto de referencia para las coordenadas estereotáxicas, mientras que en los ratones, las inyecciones se realizaron tomando Bregma como punto de referencia, de acuerdo con el atlas del cerebro del ratón realizado por Paxinos y Franklin (2001).

En lagartijas, las inyecciones en las estructuras estriatales se realizaron usando una aproximación contralateral para asegurarnos de que las porciones de la corteza y/o la cresta dorsal ventricular que quedan por encima de la diana deseada no se vieran afectadas por la inyección o por el recorrido de la pipeta. Para conseguirlo, el cráneo fue perforado por encima de la corteza mediodorsal y la pipeta se introdujo usando el ángulo apropiado para acceder al estriado contralateral a través del septum.

En el caso de las lagartijas, pasado un tiempo de supervivencia de 7-10 días (para los experimentos con HRP) o de 10-14 días (para los experimentos con PHA-L, BDA o RDA), los animales recibieron una sobredosis de Ketolar y fueron profundidos transcardialmente con 2 ml de solución salina (NaCl al 0'9%), seguidos de 10-15 ml de solución fijadora (formaldehído en PB 0'1M, pH 7'4 al 4%). En el caso de los ratones, tras un periodo de supervivencia de 7-8 días, los animales recibieron una sobredosis de

pentobarbital sódico, tras lo cual fueron perfundidos transcardialmente con 16 ml de PBS (0'9% NaCl in 0'1M PB, pH 7'6), seguidos de 82'5 ml de solución fijadora (formaldehído en PB 0'1M, pH 7'6 al 4%). Tras la perfusión, extrajimos cuidadosamente los encéfalos y los post-fijamos durante 4-24 horas en la misma solución fijadora a 4°C. Posteriormente, los cerebros se introdujeron en una solución de sacarosa en PB 0'1M, pH 7'6 al 30% a 4°C hasta que se sumergieron. Con un microtomo de congelación realizamos secciones frontales de 40 µm de grosor que, en cada cerebro, se separaron en series paralelas (3 en el caso de *Podarcis hispanica* y 5 en el caso de *Mus musculus*).

En los animales inyectados con HRP, la actividad peroxidásica se reveló mediante el uso de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma; en TB 0'05M, pH 8'0 al 0'02%) como cromógeno y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0'01%. En la mayoría de los casos, se añadieron sales de níquel (sulfato de amonio y níquel al 0'4%) para ennegrecer el producto de reacción (DAB-Ni).

Para los restantes trazadores comenzamos la detección (inmuno)histoquímica inhibiendo la actividad peroxidásica endógena con una solución H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tampón Tris salino (TBS), pH 7'6 al 1%, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Para visualizar la PHA-L, se aplicó el método indirecto peroxidasa-antiperoxidasa (PAP; Sternberger, 1979 [cabra anti-PHA-L, 1:2.000; mono anti-cabra IgG, 1:50; cabra PAP 1:4.000; Vector Laboratories]) y el resultado de la actividad peroxidásica se reveló utilizando DAB, tal y como se ha descrito anteriormente.

Para la detección de la BDA, las secciones se incubaron en el complejo avidina-biotina (ABC Elite kit; Vector Laboratories) en TBS con un 0'3% de Triton X-100, bien durante toda la noche a 4°C o bien durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la actividad peroxidásica se reveló con DAB-Ni tal y como se ha descrito con anterioridad.

Para la detección de la RDA, las secciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia equipado con un filtro N2.1 (Leica, Heidelberg, Alemania), o bien se trataron para la inmunodetección de la tetrametilrodamina, en cuyo caso se utilizó un anticuerpo primario específico (anti-tetrametilrodamina obtenida en conejo, Molecular Probes, Cat. # A-6397, Lot: 7051-3) diluido 1:4.000 en TBS con Triton X-100 al 0'3%, seguido de un procedimiento PAP estándar (cabra anti-conejo IgG, 1:100, Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, The Netherlands; conejo PAP, 1:800, Nordic

Immunological Labs.). La marca peroxidásica resultante se reveló tal y como se ha descrito arriba, en algunos casos con sales de níquel. Estos protocolos inmunohistoquímicos no daban marcaje cuando se aplicaban en tejidos procedentes de animales que no habían recibido inyecciones de RDA o de PHA-L en su caso. Más aún, la omisión del anticuerpo primario en secciones de animales a los que se les había inyectado RDA hacía que el tejido no presentara marca.

Tras el procedimiento (inmuno)histoquímico, las secciones se lavaron en gelatina templada (30-40°C) diluida en TB al 0'2% y se montaron en portaobjetos limpios. En la mayoría de los casos, las preparaciones fueron posteriormente contrastadas con azul de toluidina acidificado y cubiertas con Permount (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA) o Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). Para observar la RDA con fluorescencia, las secciones fueron recogidas inmediatamente después del corte y montadas tal y como se ha descrito arriba. Posteriormente se secaron al aire y se cubrieron con Mowiol (Osborn y Weber, 1982).

### **3.3 SOBRE LA METODOLOGÍA DEL TRAZADO DE CONEXIONES**

La técnica de trazado de conexiones empleada en este trabajo presenta algunos problemas potenciales que han sido tomados cuidadosamente en cuenta a la hora de interpretar nuestros resultados. En primer lugar, aunque las dextran-aminas se utilizan generalmente como trazadores anterógrados, en nuestras manos, estos trazadores dan un transporte retrógrado fidedigno. En diversos trabajos previos de nuestro grupo, se ha comparado el transporte retrógrado obtenido con HRP con el obtenido con BDA, sin haber observado nunca diferencias sustanciales, más allá del hecho de que la BDA daba lugar a una mejor definición morfológica de las estructuras marcadas (Lanuza y Halpern, 1998; Lanuza et al., 1997; 1998; Martínez-Marcos et al., 1999). Algunos de los cuerpos celulares marcados presentan una apariencia similar a la obtenida con la técnica de Golgi que sugiere que la captación se puede haber debido a la rotura fibras de paso, pero en todos aquellos lugares en los que aparece marcaje retrógrado, siempre hay células que muestran un marcaje granular indicativo de una captación sináptica de los trazadores. Por ello, confiamos razonablemente en que el transporte retrógrado observado revela aferencias al lugar de inyección. Además, existen datos previos de otros grupos del uso de

dextran-aminas como trazadores retrógrados en diversas especies (Schofield y Cant, 1996; Marín et al., 1997; Dávila et al., 2002). Por tanto, no hay ninguna razón para creer que las dextran-aminas no son poderosos trazadores retrógrados, al menos cuando se aplican bajo las condiciones que nosotros utilizamos. De hecho, tal y como discutiremos, nuestros experimentos de trazado retrógrado replican los resultados de experimentos similares con fluorogold en ratas (Brog et al., 1993) confirmando las similitudes esperadas en las conexiones amígdalo-estriatales entre diferentes especies de roedores y la validez del uso de las dextran-aminas como trazadores retrógrados. Finalmente, nuestros resultados del trazado retrógrado de las vías amígdalo-estriatales son totalmente coherentes con aquellos del trazado anterógrado de las mismas proyecciones (ver resultados de los capítulos 4 y 5).

El segundo problema de nuestro método deriva del hecho de que las dextran-aminas se transporten tanto anterógradamente como retrógradamente, lo que complica la interpretación de los resultados del marcaje de fibras, ya que podrían deberse a transporte anterógrado desde células localizadas en el lugar de inyección o desde células marcadas retrógradamente que tengan colaterales axónicas en la amígdala y en el estriado. Este serio problema se ha abordado siguiendo dos estrategias. En primer lugar, únicamente hemos considerado la existencia de una proyección cuando ésta se ha observado mediante el uso tanto de trazado retrógrado tras inyecciones en el estriado como de trazado anterógrado desde inyecciones en la amígdala. En segundo lugar, en nuestros experimentos de trazado anterógrado de las eferencias amigdalinas también hemos estudiado el transporte retrógrado para evaluar la posibilidad de marcaje axónico colateral desde aferencias comunes al lugar de inyección y al estriado. Siempre que se ha observado marcaje similar al de un Golgi en estructuras que también proyectan al estriado, los resultados se consideran tentativos y apuntamos la necesidad de experimentos adicionales para confirmarlos.

### 3.4 DETECCIÓN HISTOQUÍMICA E INMUNO-HISTOQUÍMICA DE MARCADORES NEUROQUÍMICOS

En nuestro laboratorio se encuentra disponible una colección de preparaciones de secciones cerebrales de *Podarcis hispanica* teñidas con diferentes técnicas (ver Font et al.,

1995) que fue utilizada para realizar un estudio detallado del telencéfalo basal en esta especie. La histoquímica para la acetil colinesterasa (Achasa; Geneser-Jensen y Blackstad, 1971; n=6) y la detección inmunohistoquímica de la tirosina hidroxilasa (TH; n=2) y la sustancia P (SP; n=3) resultaron particularmente útiles para la caracterización de la quimioarquitectura del prosencéfalo basal de *Podarcis*. La inmunoreactividad para la TH fue detectada mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal anti-TH (Incstar, Stillwater, MN), un anticuerpo biotinilado de caballo contra IgG de conejo y el método ABC. La inmunoreactividad para la SP fue detectada con un anticuerpo policlonal de conejo anti-SP (CRB, Cambridge, UK) y el método PAP (para detalles metodológicos, ver Font et al., 1995). Además se utilizaron preparaciones con tinción de Nissl convencional (n=5)

### **3.5 ADQUISICIÓN Y PROCESADO DE LAS IMÁGENES**

Las fotografías de las imágenes al microscopio óptico se obtuvieron mediante un microscopio Leitz DMRB equipado con una cámara digital Leica DC 300 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Las imágenes digitales se importaron al Adobe Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, CA) donde se homogeneizó la iluminación (restándoles el fondo), y se convirtieron a escala de grises (8 bits). En algunas secciones teñidas con azul de toluidina y antes de la conversión a escala de grises, algunos colores se corrigieron selectivamente para mejorar la visualización de la marca. Las imágenes a pocos aumentos, se compusieron ensamblando fotografías a gran aumento en el Adobe Photoshop. Para la obtención de las imágenes finales, se ajustó el brillo y el contraste y se fijó la resolución en 600 dpi. No se realizó ninguna manipulación o filtrado adicional sobre las imágenes. Finalmente, las láminas se diseñaron y se marcaron con el Adobe Photoshop.

# Capítulo 4

ESTUDIO DE LAS  
PROYECCIONES  
AMÍGDALO-ESTRIATALES  
EN *Podarcis hispanica*

## 4.1 INTRODUCCIÓN

El estudio comparado del telencéfalo de los vertebrados tetrápodos se ve dificultado por dos importantes diferencias entre el prosencéfalo de los mamíferos y el de los saurópsidos (aves y reptiles). Por una parte, los mamíferos cuentan un córtex con seis capas perfectamente desarrollado (isocórtex o neocórtex) del que los saurópsidos carecen, mientras que estos poseen una estructura subventricular situada justo por encima del estriado dorsal que protruye medialmente obliterando el ventrículo, de ahí que se la conozca con el nombre de cresta dorsal ventricular (DVR; ver Ulinski, 1983). El significado comparado de esta estructura, así como la identidad de su homólogo en el cerebro de los mamíferos, ha sido el centro de un extenso debate (ver Lohman y Smeets, 1990; Karten, 1991, 1997; Butler, 1994; Striedter, 1997; Kaas y Reiner, 1999). El uso de técnicas de trazado anatómico en reptiles y en aves ha demostrado que la DVR es la diana de proyecciones ascendentes desde, al menos, tres núcleos diferentes del tálamo dorsal que son considerados generalmente relevos de información visual, auditiva y somatosensorial (Karten, 1969; Karten et al., 1973; Lohman y van Woerden-Verkley, 1978; Ulinski, 1983; Bruce y Butler, 1984b). Por ello, la DVR fue comparada con el neocórtex sensorial de mamíferos o con algunas poblaciones neuronales dentro de él (Karten, 1991; Powers y Reiner, 1993; Butler, 1994).

En reptiles, la DVR origina proyecciones descendentes al estriado dorsal subyacente (Ulinski, 1978; Voneida y Sligar, 1979; González et al., 1990; Hoogland, 1997) que se consideran el sustrato anatómico de la integración sensorimotora telencefálica (ver Ulinski, 1983). De acuerdo con los datos de las aferencias talámicas, se propuso que estas proyecciones eran equivalentes a los circuitos cortico-estriatales del cerebro de mamíferos.

Recientemente, esta hipótesis se ha puesto en tela de juicio basándose en los datos existentes acerca del desarrollo, topología, conexiones y expresión de genes homeóticos en el cerebro de mamíferos y de amniotas no mamíferos. En primer lugar, los estudios sobre la expresión de genes homeóticos durante el desarrollo (Smith-Fernández et al., 1998; Puelles et al., 2000) indican que la DVR no es homóloga del neocórtex (que deriva del palio dorsal embrionario), sino que lo es de derivados del palio lateral y de una región no definida

previamente,

justo ventral al palio lateral y dorsal al estriado, a la que se le ha llamado palio ventral (Puelles et al., 2000).

En mamíferos, los derivados del palio ventral parecen corresponder a partes del complejo claustro-amigdalino (incluidos el área endopiriforme ventral y partes de la amígdala basolateral). Esta interpretación se ajusta, parcialmente, a la hipótesis de Bruce y Neary (Bruce y Neary, 1995b), según la cual la DVR de reptiles es comparable a la amígdala lateral de mamíferos. Una hipótesis alternativa que también encaja parcialmente con los datos de la expresión de genes homeóticos, es la propuesta por Holmgren (1925) y revisada por Striedter (1997), quien propuso que la DVR del prosencéfalo de saurópsidos es comparable al complejo claustro-endopiriforme de mamíferos. Las interpretaciones alternativas de Bruce y Neary (1995b) y de Striedter (1997) se pueden reconciliar usando los datos hodológicos de lagartijas, que indican la existencia de dos divisiones antero-posteriores funcionalmente distintas en la DVR (Lanuza et al., 1998). La DVR anterior (ADVR) contiene, aparentemente, tres áreas sensoriales unimodales (auditiva, medial; somatosensorial, intermedia; visual, lateral; ver Ulinski, 1983), mientras que la DVR posterior (PDVR) parece ser una estructura asociativa que recibe proyecciones desde los tres campos sensoriales de la ADVR (Andreu et al., 1996; Lanuza et al., 1998). Tanto las aferencias intra y extratelencefálicas de la PDVR (Belekhova y Chkheidze, 1991, 1992; Andreu et al., 1996; Lanuza et al., 1998) como sus proyecciones al hipotálamo (Bruce y Neary, 1995a, Lanuza et al., 1997; Martínez-Marcos et al., 1999b) sugieren que la PDVR es parte de la amígdala basolateral de reptiles.

En vista de la parcelación de la DVR de reptiles, es necesario reevaluar tanto el alcance como la importancia de las proyecciones desde la DVR a los ganglios basales. El objetivo de este estudio es la caracterización de las proyecciones estriatales de la parte caudal de la cresta dorsal ventricular en la lagartija *Podarcis hispanica*.

Para ello y mediante las técnicas de trazado anatómico analizamos las conexiones del polo caudal de la DVR con el prosencéfalo basal de *Podarcis*. Los resultados de estos experimentos indicaron la presencia de importantes proyecciones desde la presunta amígdala basolateral (PDVR y estructuras adyacentes) a diferentes partes del estriado, incluido el núcleo accumbens, que serían equivalentes a las proyecciones amígdalo-estriatales presentes en el telencéfalo de los mamíferos. Estos descubrimientos tienen

importantes implicaciones para la comprensión de la neuroanatomía comparada y la evolución del telencéfalo de los amniotas.

## **4.2 RESULTADOS**

En primer lugar, para facilitar un análisis apropiado de los resultados de los experimentos de trazado de conexiones, resumimos los datos cito y quimioarquitectónicos de la cresta dorsal ventricular y realizamos un estudio detallado del telencéfalo basal de *Podarcis hispanica*, incluyendo también una descripción de la cito y de la quimioarquitectura del mismo. A continuación y de acuerdo con nuestro diseño experimental, describimos el marcaje retrógrado resultante de las inyecciones en el telencéfalo basal con el objetivo de localizar las células de origen de las proyecciones amígdalo-estriatales. Finalmente, estudiamos el marcaje anterógrado en el complejo estriado-palidal tras inyecciones en la formación amigdalina para corroborar los resultados obtenidos en los experimentos de trazado retrógrado y para describir con mayor detalle las proyecciones amígdalo-estriatales en *Podarcis hispanica*.

### **4.2.1 Cito y Quimioarquitectura del Polo Caudal de la DVR de *Podarcis hispanica***

La formación amigdalina de *Podarcis hispanica* está constituida por la porción caudal de la cresta dorsal ventricular y áreas vecinas (Lanuza et al. 1997; 1998). En la formación amigdalina de *Podarcis* se distingue una división dorsal (que abarca la cresta dorsal ventricular posterior, la amígdala dorsolateral y la amígdala lateral), una división olfato-receptora cortical (formada por el núcleo esférico, el núcleo del tracto olfativo accesorio, el núcleo del tracto olfativo lateral, la amígdala ventral anterior y la amígdala ventral posterior) y una división centromedial (compuesta por el área de transición estriado-amigdalina, el núcleo de la *stria terminalis* y la amígdala medial). Además, en este trabajo consideramos la existencia de una estructura adicional que es adyacente a la ADVR más lateral, y profunda al córtex lateral rostral que denominamos córtex profundo lateral (dLC) y que pensamos constituye la extensión rostral de la amígdala. Esta estructura es rostral a la amígdala dorsolateral (DLA) pero, al contrario que ésta, muestra una baja densidad celular y es negativa para la histoquímica de la acetil colinesterasa.

Además, como veremos más adelante, el dLC y el DLA difieren en su patrón de conexiones con el estriado.

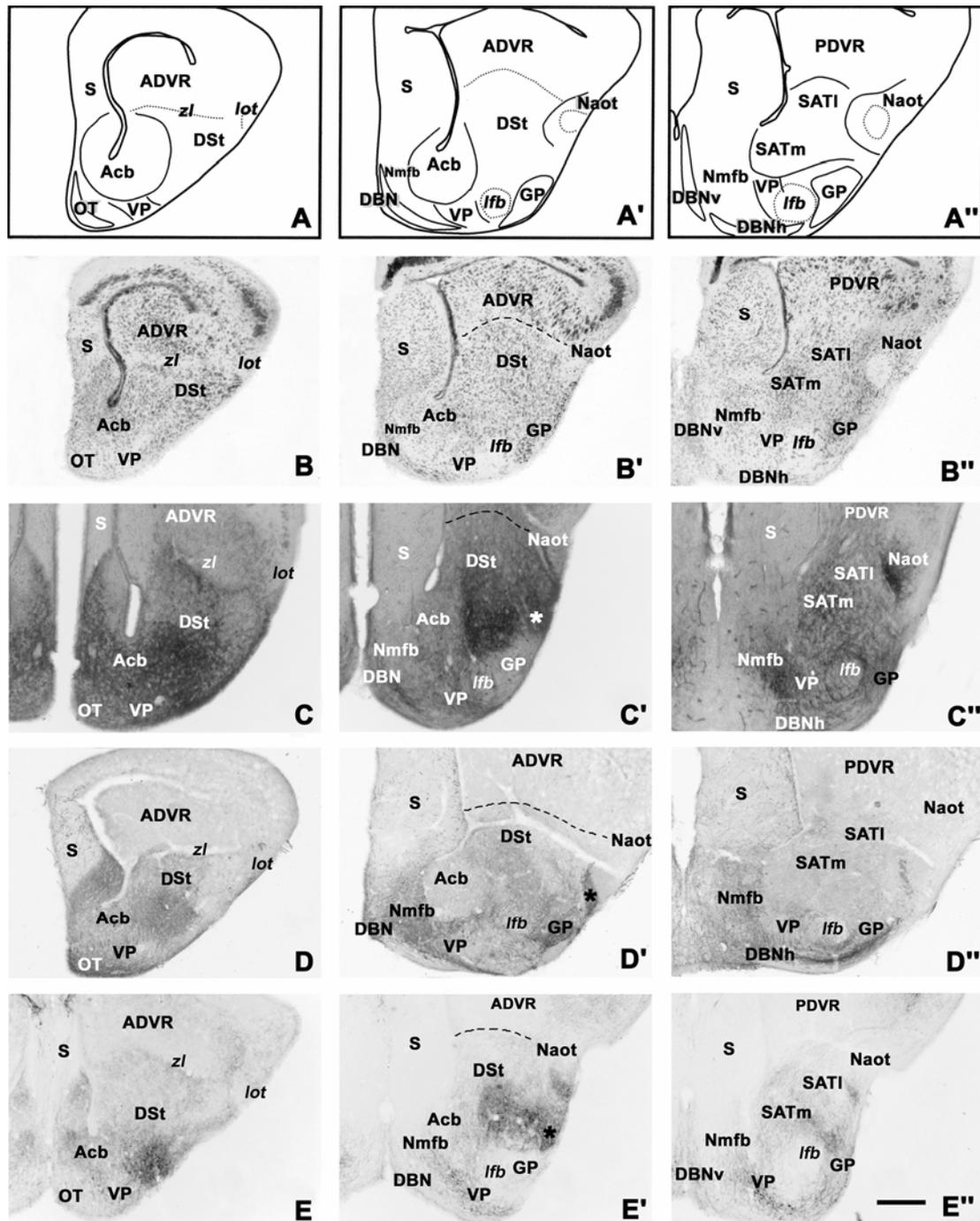
#### **4.2.2 Cito y Quimioarquitectura del Telencéfalo Basal de *Podarcis hispanica* (Figura 7)**

En mamíferos, el telencéfalo basal se compone de diferentes estructuras que incluyen los ganglios basales, el núcleo de la banda diagonal, la *substantia innominata* y el núcleo basal de Meynert. Los ganglios basales están formados por el estriado dorsal (caudado-putamen) y ventral (núcleo accumbens y tubérculo olfativo) así como por el *globus pallidus* lateral y el *pallidum* ventral. Caudalmente, algunas de estas estructuras se continúan con otras divisiones del telencéfalo como el núcleo de la *stria terminalis* y el *globus pallidus* medial o intracapsular.

El estudio realizado por Russchen et al. (1987) fue el primero en intentar identificar todas estas estructuras en un reptil. Para ello, utilizó una batería de marcadores (inmuno)histoquímicos que definían, más o menos específicamente, algunos de estos núcleos. Nosotros hemos utilizado algunos de estos marcadores (acetil colinesterasa: Achasa; sustancia P: SP; tirosina hidroxilasa: TH), junto con la tinción de Nissl, para delinear los componentes del telencéfalo basal en *Podarcis hispanica*. Nuestros resultados indican que el patrón es similar al descrito en el gecko (Russchen et al., 1987) y nos permiten proponer una cito y una quimioarquitectura más detallada para el telencéfalo basal de los reptiles.

Mediante el uso de criterios citoarquitectónicos clásicos (tamaño, forma y densidad celular; distribución de fibras y tractos fibrilares; propiedades del marcaje), se pueden distinguir diversos grupos celulares en el telencéfalo basal de *Podarcis hispanica*.

El límite dorsal de los ganglios basales está claro a niveles rostrales debido a la existencia de una zona libre de células, la *zona limitans (zl)*, que separa a éstos de la ADVR (Fig. 7A-A', B-B'). Lateralmente, la *zl* termina en el núcleo del tracto olfativo lateral. Caudalmente, la *zl* desaparece y este hecho señala el final de la ADVR y el comienzo de la PDVR (Lanuza et al., 1998; Fig. 7A'', B'').



**Figura 7: Cito y Quimioarquitectura del Complejo Amigdalino en la Lagartija.** Secciones frontales rostrales (columna izquierda), intermedias (columna central) e intermedio-caudales (columna derecha) del hemisferio derecho de *Podarcis hispanica* que muestran la citoarquitectura (paneles A y B, fila superiores) y quimioarquitectura (paneles C-E) del complejo estriado-palidal. El panel A muestra unos dibujos semi-esquemáticos a cámara clara de las secciones frontales teñidas con azul de toluidina en el panel B. El panel C muestra secciones tratadas para la histoquímica de la acetil colinesterasa. Los paneles inferiores muestran secciones inmunomarcadas para la sustancia P (panel D) y para la tirosina hidroxilasa (panel E). El asterisco en C'-E' indica la posición de un grupo celular característico en la porción ventral del St (ver resultados). La barra de calibración en E'' es válida para toda la figura y representa 250  $\mu$ m.

A niveles rostrales, el estriado ventral (núcleo accumbens, Acb; tubérculo olfativo, OT; de Olmos y Heimer, 1999) ocupa la mayor parte de la porción medial del telencéfalo basal, por lo que invade la región septal (Fig. 7A, B). El OT está presente únicamente a estos niveles, donde ocupa la superficie ventral de los hemisferios cerebrales y envuelve ventralmente al Acb. Más caudalmente (Fig. 7A', B'), el OT desaparece y su posición es ocupada por el núcleo de la banda diagonal (DBN), mientras que el Acb se reduce a un grupo celular que rodea el sulco ventral del ventrículo lateral. A esto se une la expansión de la otra principal estructura estriatal, el estriado propiamente dicho o estriado dorsal (DSt), que a este nivel ocupa la mayor parte de la extensión medio-lateral del telencéfalo basal dorsal (Fig. 7A', B').

Los marcadores histoquímicos utilizados en este estudio revelaron una mayor heterogeneidad en los niveles caudales del estriado ventral. El extremo rostral del estriado ventral parece densamente (inmuno)reactivo para la Achasa, SP y TH, aunque en el límite entre el Acb ventro-medial y el OT, la densidad de fibras TH-inmunoreactivas relativamente más baja (Fig. 7C-E). Este patrón cambia drásticamente en secciones un poco más caudales (Fig. 7C', E'). Aquí, la porción caudal del Acb muestra un (inmuno)marcaje para la Achasa (Fig. 7 C') y la TH (Fig. 7E') de moderado a bajo, así como una inmunoreactividad muy baja para la SP, que contrasta con el marcaje moderado de las estructuras vecinas (Fig. 7D').

Con respecto al DSt, sus porciones dorsal y ventral muestran características citoarquitectónicas e histoquímicas distintas. La porción dorsal del DSt adyacente a la *zl*, muestra una densidad celular relativamente alta (Fig. 7A-A', B-B') pero una reactividad baja para la Achasa (Fig. 7C-C') y muy tenue para la SP (Fig. 7D-D') y la TH (Fig. 7E-E'). Por el contrario, la porción ventral del DSt muestra una intensa reactividad para la Achasa (Fig. 7C-C'), una inmunoreactividad moderada e irregular para la SP (Fig. 7D-D') y una densa inervación inmunoreactiva para la TH (Fig. 7E-E'). A estos niveles, el límite lateral de la porción ventral del DSt muestra una fuerte (inmuno)reactividad para los tres marcadores utilizados en este trabajo (ver asterisco en 7C'-E').

Más caudalmente, y ya donde la *zl* desaparece, el núcleo del tracto olfativo accesorio (Naot) se adentra en el hemisferio cerebral, aumenta su tamaño y muestra una

prominente banda reactiva para la Achasa que ocupa su límite medial (Fig. 7A''-C''). A estos niveles, la mayor parte del territorio estriatal es ocupada por una estructura densa en células. Este grupo celular se corresponde con el área de transición estriado-amigdalina (SAT) definida en el gecko por Russchen y Jonker (1988). Martínez-García et al. (2002b), en base a la diferente inervación de fibras inmunoreactivas para el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), describieron una división medial (SATm) y una división lateral (SATl) dentro del SAT, ya que la última mostraba una inervación de fibras CGRPérgicas más densa. El SATm parece la continuación caudal del Acb, con quien comparte muchas características (inmuno)histoquímicas (Fig. 7), aunque el SATm muestra una reactividad para la Achasa ligeramente mayor. Por otro lado, el SATl parece la continuación lateral de la porción dorsal del DSt y se encuentra medial a la porción engrosada del Naot aumentado (Fig. 7A''-B''). Si lo comparamos con el SATm, el SATl muestra una densidad celular más baja (Fig. 7B'') y una (inmuno)reactividad para la Achasa (Fig. 7C'') y para la TH (Fig. 7E'') algo más tenue. El SATm se continúa caudalmente con una estructura que está atravesada por la *stria terminalis* (st) a su salida de la PDVR (Lanuza et al., 1997) y que por ello se denomina núcleo de la *stria terminalis* (Fig. 11B; BST).

En el territorio palidal de *Podarcis hispanica* se pueden distinguir tres compartimentos atendiendo a sus características citoarquitectónicas, histoquímicas y hodológicas: el *globus pallidus*, el *pallidum* ventral y el *pallidum* medial (a partir de ahora utilizaremos los términos castellanos de globo pálido, pálido ventral y pálido medial). El globo pálido (GP), que es rico en células de gran tamaño con abundantes corpúsculos de Nissl, ocupa el límite ventro-lateral de los hemisferios telencefálicos a niveles medio-caudales (Fig. 7A'-A'', B'-B''), donde rodea ventro-lateralmente al tracto prosencefálico lateral (*lfb*). El GP es bastante heterogéneo desde el punto de vista histoquímico. Su porción anterior aparece uniformemente pálida en preparaciones de histoquímica para la Achasa (Fig. 7C') o de inmunomarcaje para la TH (Fig. 7E'), pero la inmunotinción para la SP revela dos divisiones: un campo densamente reactivo, profundo y dorsal y una región prácticamente desprovista de marca, superficial y ventral (Fig. 7D'). Por otra parte, el GP caudal, muestra una leve e irregular reactividad para la Achasa (Fig. 7C''), una aparente patrón laminar de inmunoreactividad para la SP (Fig. 7D'') y una moderada y desigual inervación de fibras TH-inmunoreactivas (Fig. 7E''). Más medialmente en el

telencéfalo basal, justo ventral al Acb y al SATm, y medial al *lfb*, hay un grupo de células grandes y dispersas que aparentemente constituyen el pálido ventral (VP) de *Podarcis*. A niveles rostrales (Fig. 7D) el VP se ve como una estrecha área pobre en células, ventral al Acb y lateral al OT, moderadamente reactiva para la Achasa (Fig. 7C) y para la SP (Fig. 7D) y de inmunoreactividad ligera para la TH (Fig. 7E).

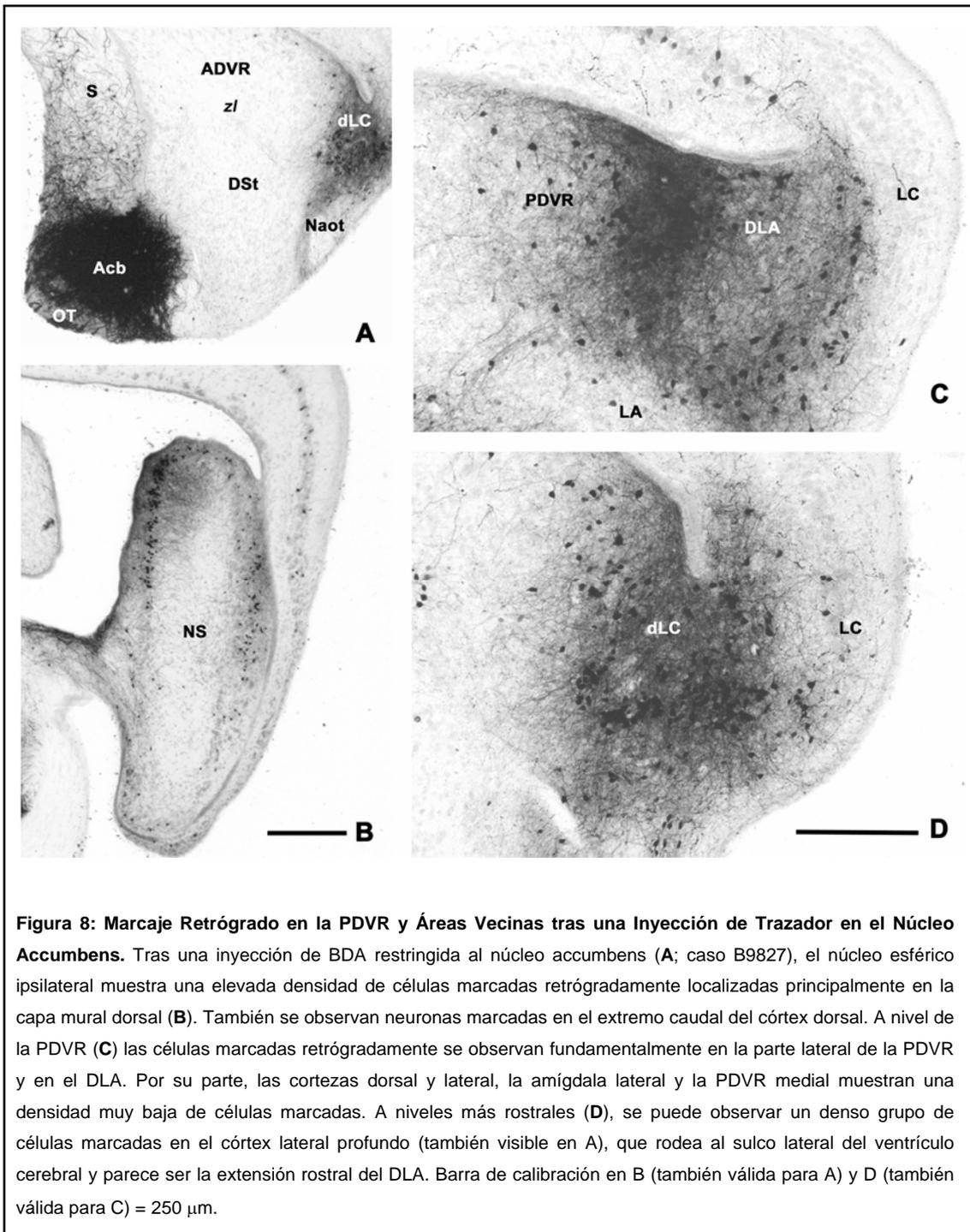
Más caudalmente, el VP muestra una reactividad para la Achasa tenue (Fig. 7C'-C''), una inmunoreactividad para la SP débil (pero heterogénea, Fig. 7D'-D'') y una inervación inmunoreactiva para la TH moderada (Fig. 7E'-E''). El pálido medial está compuesto por dos grupos celulares: el núcleo de la banda diagonal (DBN) y el núcleo del tracto prosencefálico medial (Nmfb), ambos rostrales al núcleo de la comisura anterior. Histoquímicamente, estas estructuras muestran un neuropilo moderadamente reactivo para la histoquímica de la Achasa (Fig. 7C'), especialmente prominente a niveles caudales (Fig. 7C''), así como numerosas células reactivas para la Achasa (sólo visibles a gran aumento, no mostradas). La inmunohistoquímica para la SP da lugar a un marcaje en el Nmfb de moderado a elevado, mientras que la capa celular del DBN aparece prácticamente sin marca (Fig. 7D'-D''). Finalmente, el DBN/Nmfb apenas muestra fibras TH-inmunoreactivas (Fig. 7E'-E'').

#### **4.2.3 Marcaje Retrógrado en la Amígdala Paliar de *Podarcis hispanica* tras Inyecciones en el Estriado**

Se realizaron un total de 7 inyecciones en el estriado ventral y dorsal. El marcaje retrógrado obtenido tras estas inyecciones se describe a continuación.

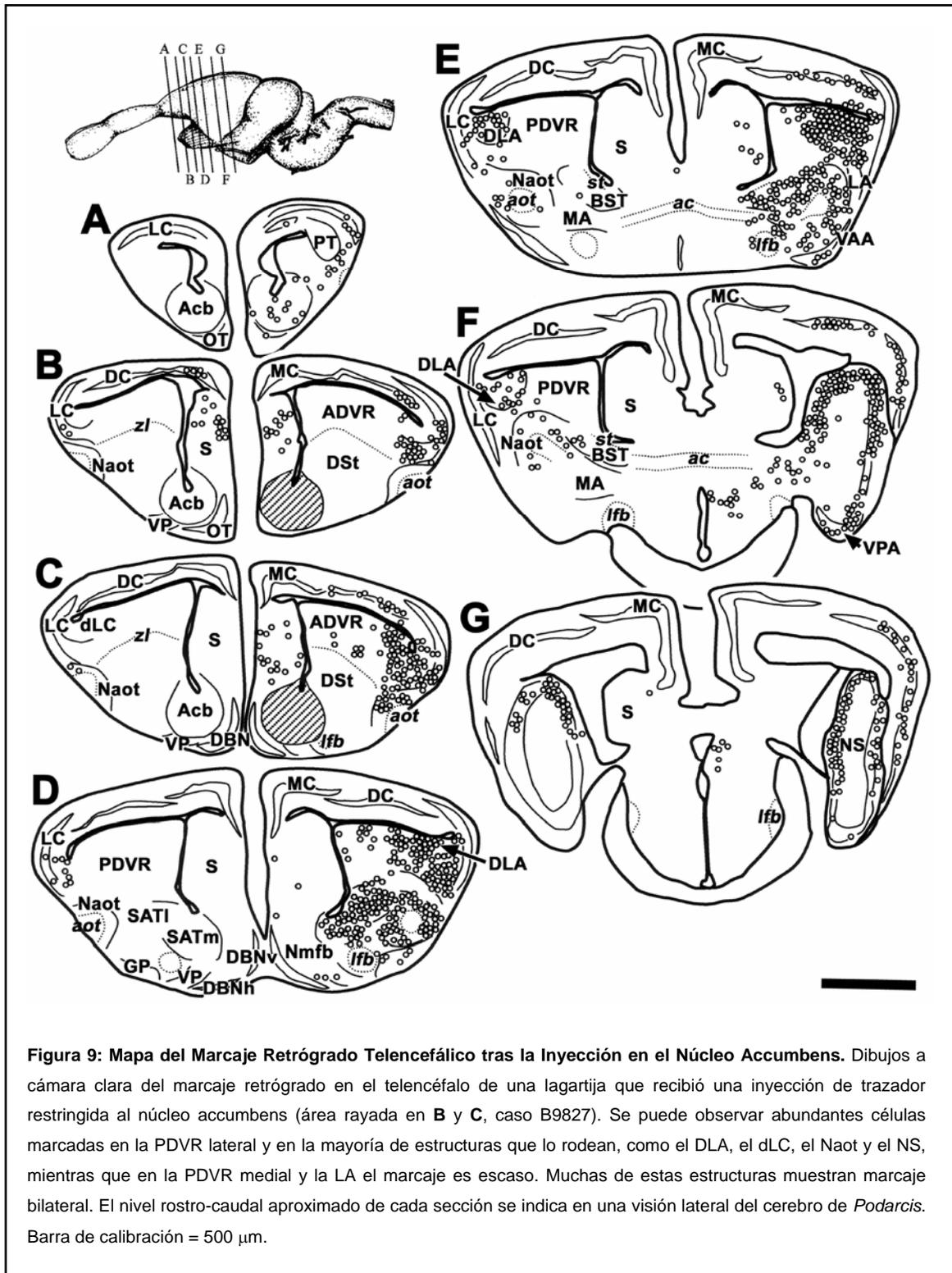
##### ***4.2.3.1 Inyecciones en el Núcleo Accumbens (Estriado Ventral)***

Cuatro de las inyecciones se centraron en el Acb. El caso B9827 se describe con detalle como un experimento representativo (Fig. 8 y Fig. 9). Se trata de una inyección de BDA que abarca la mayoría del Acb (Fig. 9) y que dio lugar a marcaje retrógrado en las tres divisiones de la amígdala (dorsal, cortical y centromedial; Lanuza et al., 1997). En la división cortical de la amígdala se encontró marcaje retrógrado bilateralmente en el núcleo esférico (NS) (principalmente en la capa mural, en su parte dorsal, Fig. 8B y Fig. 9F-G) y en el Naot (Fig. 9D-E). También aparecían células marcadas en la VAA y VPA (Fig. 9E-F).



En la división dorsal amigdalina se podían observar un gran número de neuronas marcadas retrógradamente en el DLA (de manera bilateral, Fig. 8C y 9D-F), en la PDVR (de manera ipsilateral), en donde el marcaje celular era especialmente denso en su parte más lateral a niveles caudales (Fig. 8C y Fig. 9D-E) y en el dLC ipsilateral (Fig. 8D y Fig. 9C), si bien observamos unas pocas células marcadas en el dLC contralateral). La LA

estaba casi desprovista de marcaje retrógrado (Fig. 8C), de modo que aparecía como un área sin marca que separaba el Naot y el DLA (Fig. 9D-E).



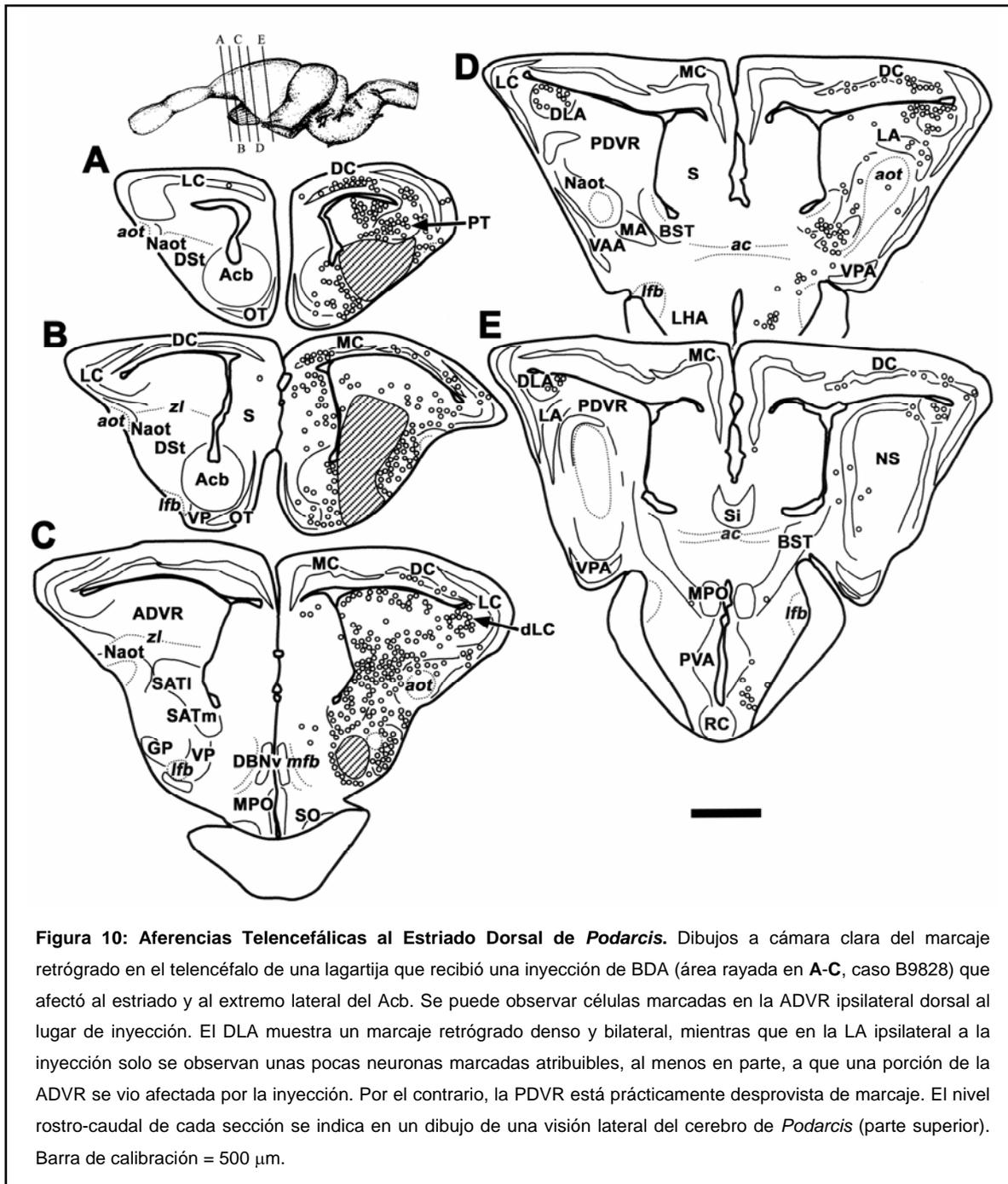
Las células marcadas retrógradamente en la división amigdalina centromedial también eran muy abundantes, y se localizaron bilateralmente (con una clara dominancia ipsilateral) en la parte lateral del BST (Fig. 9F) e ipsilateralmente en el SAT y la amígdala medial (MA) (Fig. 9D-E).

En otro caso (B9807) una inyección de BDA muy extensa se localizó en el Acb caudal, pero también afectó al SAT rostral, al VP y a la porción ventral del septum. En esta inyección, la amígdala presentaba un patrón de marcaje retrógrado similar al descrito anteriormente, pero además se encontraron células marcadas en la LA y en la PDVR medial ipsilaterales y en la MA y el SAT contralaterales (marcaje que pudo deberse a la aproximación contralateral. Datos no ilustrados).

#### ***4.2.3.2 Inyecciones en el Estriado Dorsal***

En tres casos, las inyecciones se centraron en el DSt, aunque también afectaban a la porción lateral del Acb. En todos ellos, el marcaje retrógrado era similar. La inyección B9828 (Fig. 10), descrita como un ejemplo representativo, se centraba en el DSt rostral, pero afectó parcialmente al VP y al Acb.

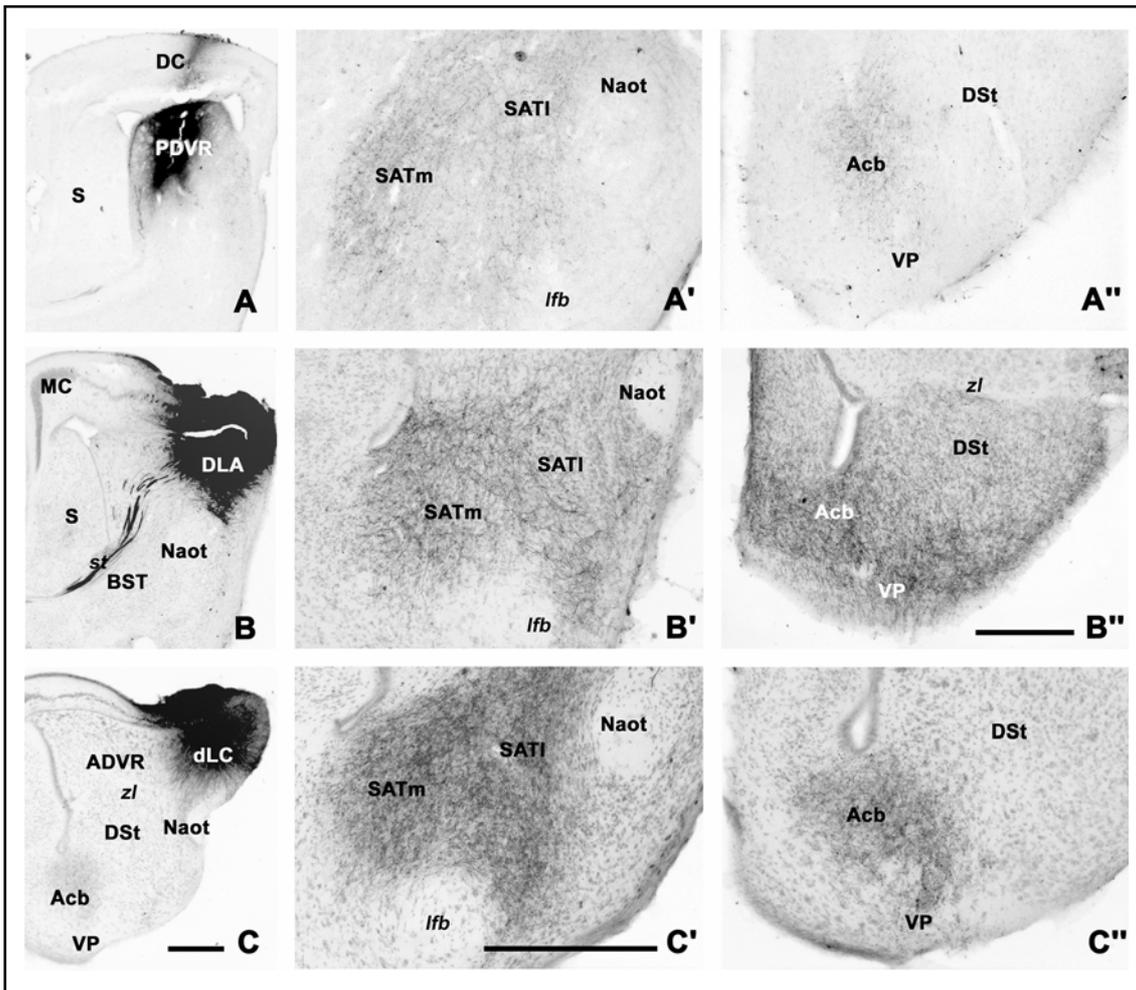
En la división dorsal amigdalina se localizó marcaje retrógrado, ipsilateralmente en el dLC y en la PDVR (especialmente a niveles rostrales), así como en la LA (Fig. 10D), y bilateralmente en el DLA (con una densidad de marcaje celular similar en ambos hemisferios) (Fig. 10D-E). Es interesante resaltar que estas inyecciones mostraron abundante marcaje retrógrado en la cresta dorsal ventricular anterior, pero escaso en la PDVR (Fig. 10A-D). En la división cortical amigdalina, también se observaban unas pocas células marcadas en la porción medial del Naot (Fig. 10C-D) y en la capa mural medial del NS (Fig. 10E). Por último, en la división centromedial de la amígdala, se encontraron unas cuantas células marcadas en el hemisferio ipsilateral en el SAT (principalmente en el SAT lateral Fig. 10C) y en el BST (Fig. 10D). También se encontró marcaje en la MA ipsilateral (Fig. 10D) y en mucha menor medida en la MA contralateral (datos no ilustrados).



**Figura 10: Aferencias Telencefálicas al Estriado Dorsal de *Podarcis*.** Dibujos a cámara clara del marcaje retrógrado en el telencefalo de una lagartija que recibió una inyección de BDA (área rayada en A-C, caso B9828) que afectó al estriado y al extremo lateral del Acb. Se puede observar células marcadas en la ADVR ipsilateral dorsal al lugar de inyección. El DLA muestra un marcaje retrógrado denso y bilateral, mientras que en la LA ipsilateral a la inyección solo se observan unas pocas neuronas marcadas atribuibles, al menos en parte, a que una porción de la ADVR se vio afectada por la inyección. Por el contrario, la PDVR está prácticamente desprovista de marcaje. El nivel rostro-caudal de cada sección se indica en un dibujo de una visión lateral del cerebro de *Podarcis* (parte superior). Barra de calibración = 500  $\mu$ m.

#### 4.2.4 Transporte Anterógrado desde Inyecciones en la Amígdala Palial en *Podarcis hispanica*

En total efectuamos un total de 19 inyecciones en la PDVR y áreas adyacentes. El marcaje anterógrado resultante (Fig. 11) se describe a continuación.



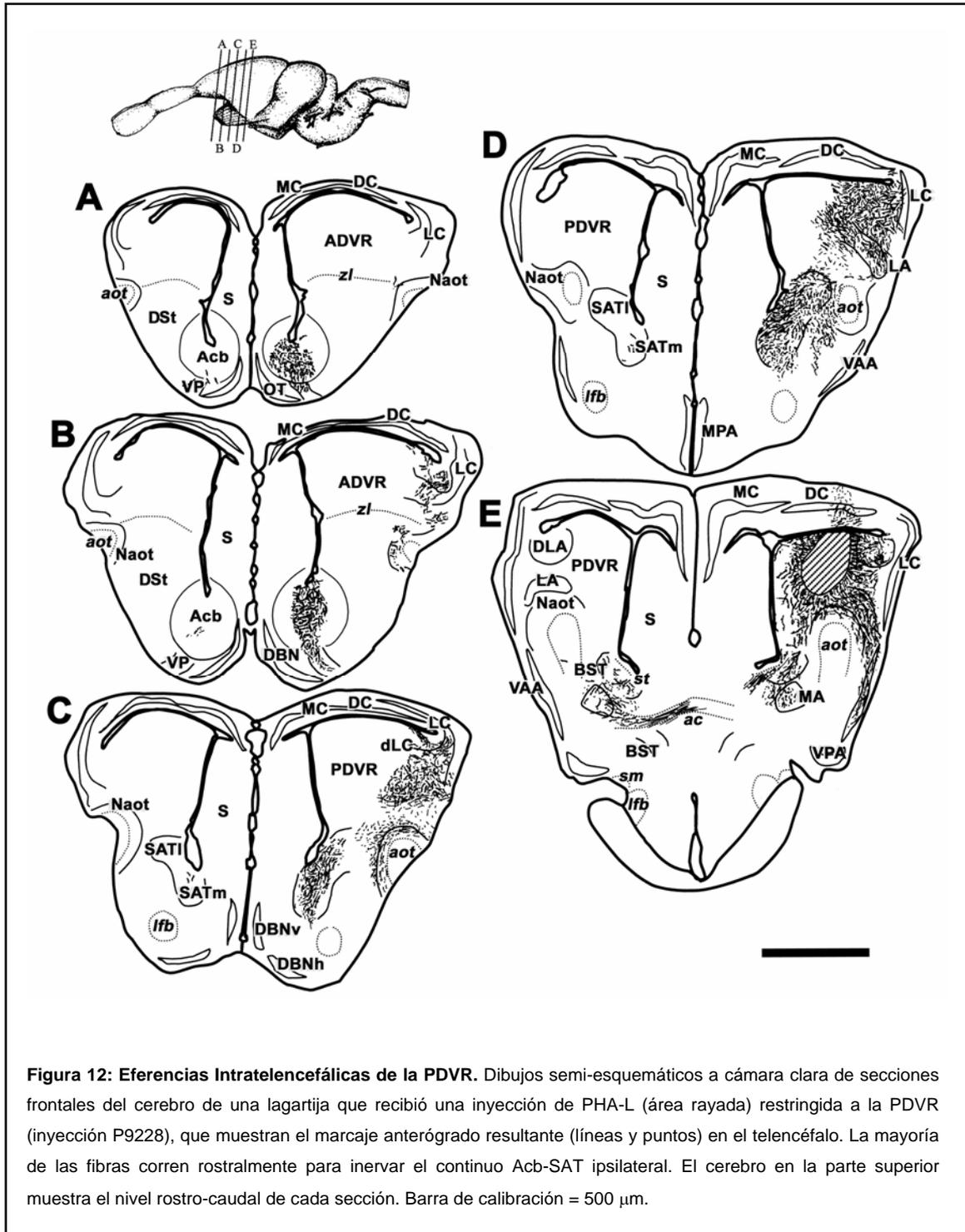
**Figura 11: Marcaje Anterógrado en el Estriado tras Inyecciones de Trazadores en el Complejo Amigdalino.**

Marcaje anterógrado en el continuo núcleo accumbens/área de transición estriado-amigdalina tras inyecciones de trazadores en la PDVR y áreas adyacentes. Las inyecciones restringidas a la PDVR (A; caso P9228) dan lugar a marcaje anterógrado en el área de transición estriado-amigdalina (tanto en su porción medial, SATm; como en su porción lateral, SATI) (A') y en el núcleo accumbens (Acb) (A''). Por el contrario, las inyecciones que afectan a la amígdala dorsolateral (B; caso B9506) dan un marcaje anterógrado más denso y más extenso en el SAT medial y lateral (B'), en el Acb y en el estriado dorsal (DSt), en donde el marcaje anterógrado era denso (B''). Por otra parte, en las inyecciones centradas en el córtex lateral profundo (C-C''; caso B9510), el patrón de marcaje en el estriado y el pálido ipsilaterales es similar al observado en las inyecciones en la PDVR. En las tres inyecciones, se puede observar como las fibras marcadas sobrepasan los principales campos terminales en los territorios estriatales para alcanzar el VP. La barra de calibración en C (válida para la primera columna), C' (válida para la segunda columna y para A'' y C'') y B'', representan 250  $\mu$ m.

#### 4.2.4.1 Marcaje Anterógrado en el Telencéfalo Basal tras Inyecciones en la PDVR

De las ocho inyecciones realizadas en la PDVR, cuatro estaban restringidas a esta estructura. En el caso ilustrado (P9228; Fig. 12), la inyección del trazador quedó confinada a la parte central de la PDVR (Fig. 11A y Fig. 12E). Desde el lugar de inyección

partían tres tractos de fibras marcadas. Uno de ellos alcanzaba una serie de estructuras paliales a diferentes niveles rostro-caudales, tales como el Naot (Fig. 12B-E), la porción lateral de la PDVR y toda la LA (Fig. 12D-E), así como, más rostralmente, el dLC (Fig. 12B-C).



**Figura 12: Eferencias Intratelencefálicas de la PDVR.** Dibujos semi-esquemáticos a cámara clara de secciones frontales del cerebro de una lagartija que recibió una inyección de PHA-L (área rayada) restringida a la PDVR (inyección P9228), que muestran el marcaje anterógrado resultante (líneas y puntos) en el telencéfalo. La mayoría de las fibras corren rostralmente para inervar el continuo Acb-SAT ipsilateral. El cerebro en la parte superior muestra el nivel rostro-caudal de cada sección. Barra de calibración = 500  $\mu$ m.

El segundo tracto de fibras marcadas corría ventro-medialmente hasta el BST y continuaba rostralmente hasta inervar el SAT (Fig. 11A' y Fig. 12C-D) y el Acb (especialmente su parte central, Fig. 11A'' y Fig. 12A-B). Desde este campo terminal, unas cuantas fibras alcanzaban el VP (Fig. 11A'' y Fig. 12A-B).

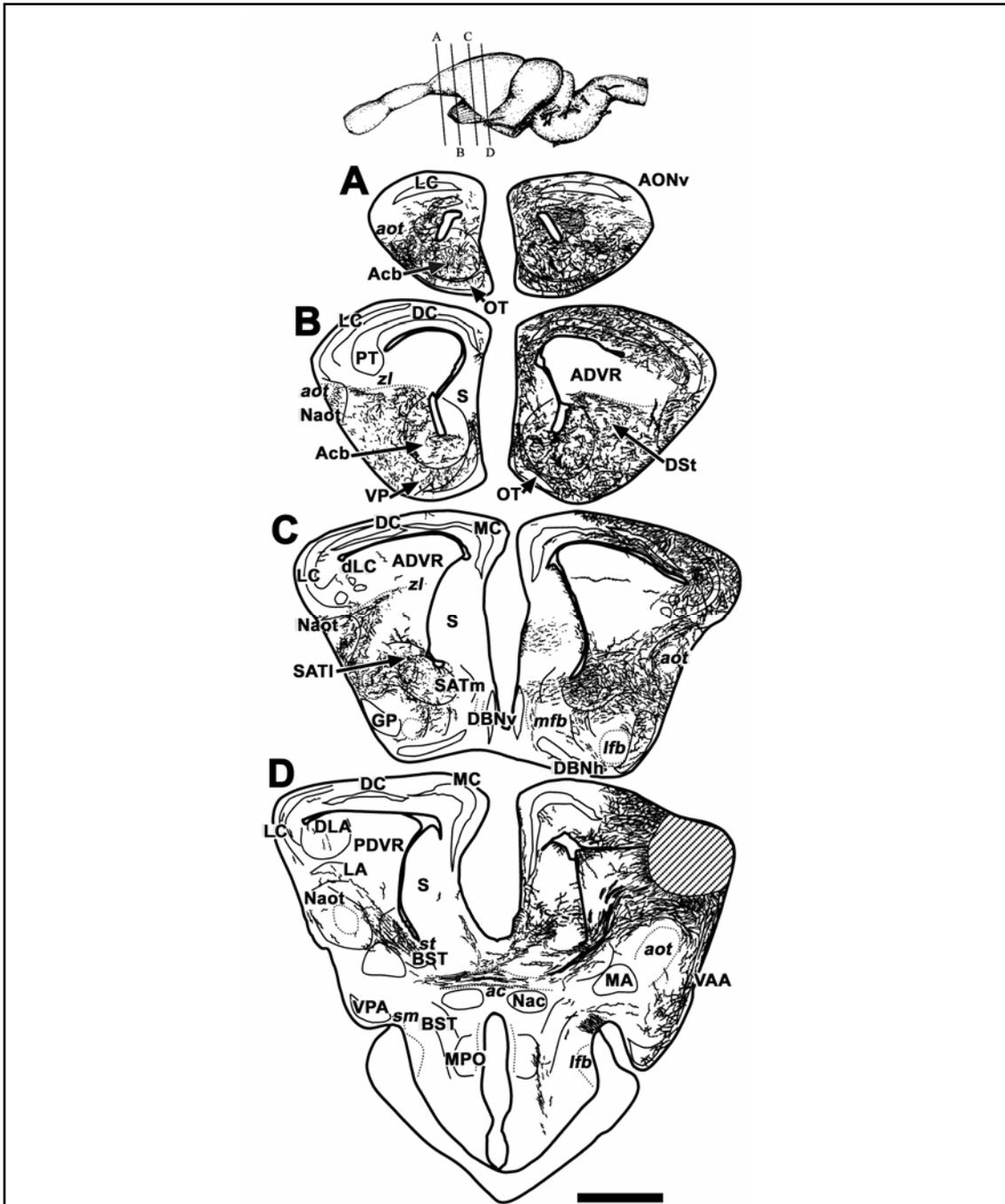
El tercer tracto de fibras marcadas abandonaba el lugar de inyección cruzando la línea media a través de la comisura anterior (*ac*). En el hemisferio contralateral las fibras marcadas se localizaban en el BST con una distribución similar a la observada en el hemisferio ipsilateral (Fig. 12E). Además, se observaban unas pocas fibras dispersas en la parte medial del SAT y en el centro del Acb contralaterales a la inyección (Fig. 12A-C).

#### **4.2.4.2 Marcaje Anterógrado en el Telencéfalo Basal tras Inyecciones en el DLA**

Seis inyecciones afectaron al DLA. El lugar de la inyección de BDA ilustrado (caso B9506; Fig. 11B y Fig. 13D) abarcó completamente al DLA pero afectó también a la porción lateral del córtex dorsal caudal (DC) y a la porción dorsal del córtex lateral caudal (LC). Posiblemente, el trazador pudo difundir hasta el límite lateral de la PDVR. Desde el lugar de inyección se observaban varios pequeños fascículos de fibras marcadas que discurrían medial y ventralmente para alcanzar la *st* y la *ac* (Fig. 13D). En relación con estas fibras se observaba un denso campo terminal en todo el SAT (Fig. 11B' y Fig. 13C) y el BST (Fig. 13C). En el SAT contralateral el marcaje era menos profuso y se observaba en una localización más lateral que en el SAT ipsilateral. En ambos hemisferios, desde el SAT, observamos que algunas fibras marcadas cursaban en dirección rostral para inervar diversas estructuras del telencéfalo basal. Así, toda la extensión del Acb mostraba un denso marcaje anterógrado (Fig. 11B'' y Fig. 13A-B), especialmente en sus porciones central y dorsal y alrededor de sulco ventral del ventrículo lateral. Igualmente, el OT mostraba un marcaje bilateral (simétrico) con predominancia ipsilateral (Fig. 13A-B). El VP también mostró un marcaje anterógrado bastante denso, visible también en el hemisferio contralateral (Fig. 11B'' y Fig. 13B).

En el DSt, el marcaje anterógrado era muy profuso (Fig. 13A-C). En todo el DSt, aparecían fibras marcadas bilateralmente (Fig. 11B'' y Fig. 13B), que alcanzaban el Naot. Este marcaje no estaba distribuido homogéneamente. Por ejemplo, en ambos hemisferios se observaba una banda prominente de fibras marcadas adyacente a la *zona limitans* (no

ilustrado). Por otro lado, y en niveles caudales del hemisferio ipsilateral, unas pocas fibras marcadas se extendían desde las regiones estriatales hasta el GP (Fig. 13C).



**Figura 13: Proyecciones Intratelencefálicas del DLA.** Dibujos a cámara clara del marcaje anterógrado (líneas y puntos) observado en los hemisferios cerebrales de una lagartija que recibió una inyección de BDA (área rayada) que incluía todo el DLA (caso B9506). El marcaje es bilateral, con una distribución simétrica en el telencéfalo basal. Las fibras marcadas se encuentran fundamentalmente en el estriado ventral y dorsal, y en ambas divisiones del SAT. El nivel aproximado de cada inyección se indica en el cerebro de la parte superior. Barra de calibración = 500  $\mu$ m.

En dos casos (H8819 y H8820) en los que se colocó un pequeño fragmento de HRP en el DLA tras quitar el córtex situado por encima (áreas dorsal, lateral y medial), el patrón de marcaje (ver Martínez-García et al., 1993) era muy similar al descrito anteriormente. Además, las inyecciones control en el córtex dorsal situado por encima del DLA daban un escaso marcaje en el Acb/SAT. Esto, junto con los resultados de trazado retrógrado (ver abajo), indica que la mayoría del marcaje fibrilar observado en el estriado y pálido tras las inyecciones que afectaban al DLA se debía al transporte anterógrado desde neuronas del DLA.

Es interesante destacar que, aunque las inyecciones de BDA o HRP en la PDVR daban lugar a un claro marcaje retrógrado talámico (ver Lanuza et al., 1998), tras inyecciones en el DLA el tálamo estaba desprovisto de células marcadas retrógradamente. Esto indica que el patrón de conexiones del DLA es distinto al de áreas vecinas como la PDVR que muestra aferencias sustanciales desde el tálamo (Lanuza et al., 1998).

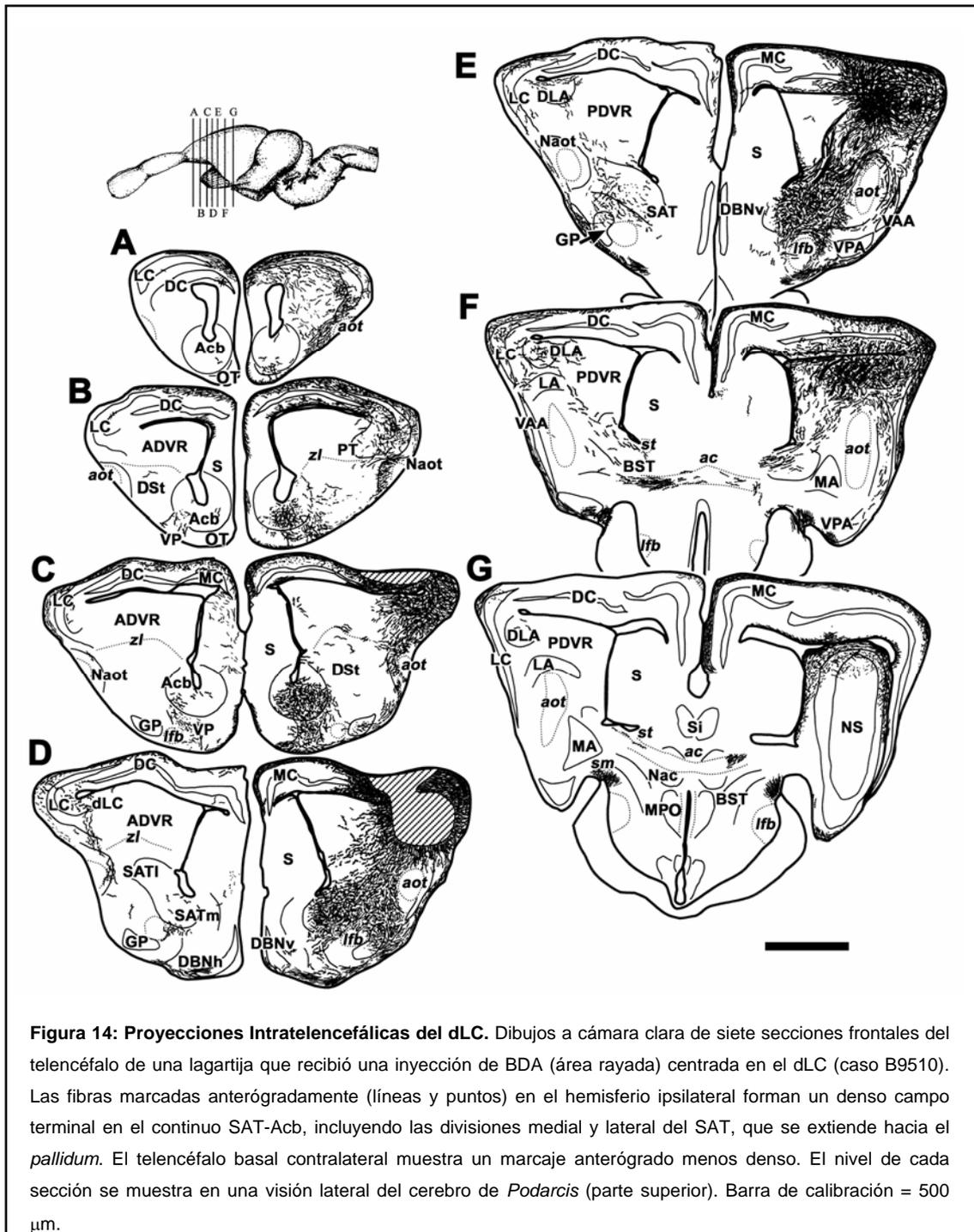
#### ***4.2.4.3 Marcaje Anterógrado en el Telencéfalo Basal tras Inyecciones en el dLC***

En un caso (B9510) la inyección se localizó rostral al DLA, estando, como consecuencia, centrada en el dLC. Esta inyección también afectó a células pertenecientes al LC y al DC adyacentes (Fig. 11C y Fig. 14D). Las fibras marcadas que abandonaban el lugar de inyección se podían seguir hasta un denso campo terminal que ocupaba todo el SAT, el extremo caudal del DSt y porciones del GP (Fig. 11C' y Fig. 14D-E) y del BST (Fig. 14F). Este sistema de fibras se extendía rostralmente hasta el Acb y el VP, donde se pudo observar un denso plexo de fibras y terminales (Fig. 11 C'' y Fig. 14B-D). El marcaje anterógrado en el Acb se localizaba principalmente en su región más caudal y en su mitad ventral. En el hemisferio contralateral también se observaban unas pocas fibras marcadas en el BST y el SAT. Igualmente, el Acb y el VP contralaterales mostraban algunas fibras marcadas con una distribución similar a la descrita para el marcaje ipsilateral (Fig. 14C).

El marcaje anterógrado encontrado en el hemisferio contralateral derivaba, sin duda, de las fibras marcadas que cruzaban la línea media a través de la *ac*. No obstante, la comisura habenuar también mostraba marcaje, probablemente relacionado con la conexión comisural del LC (Martínez-García et al., 1986).

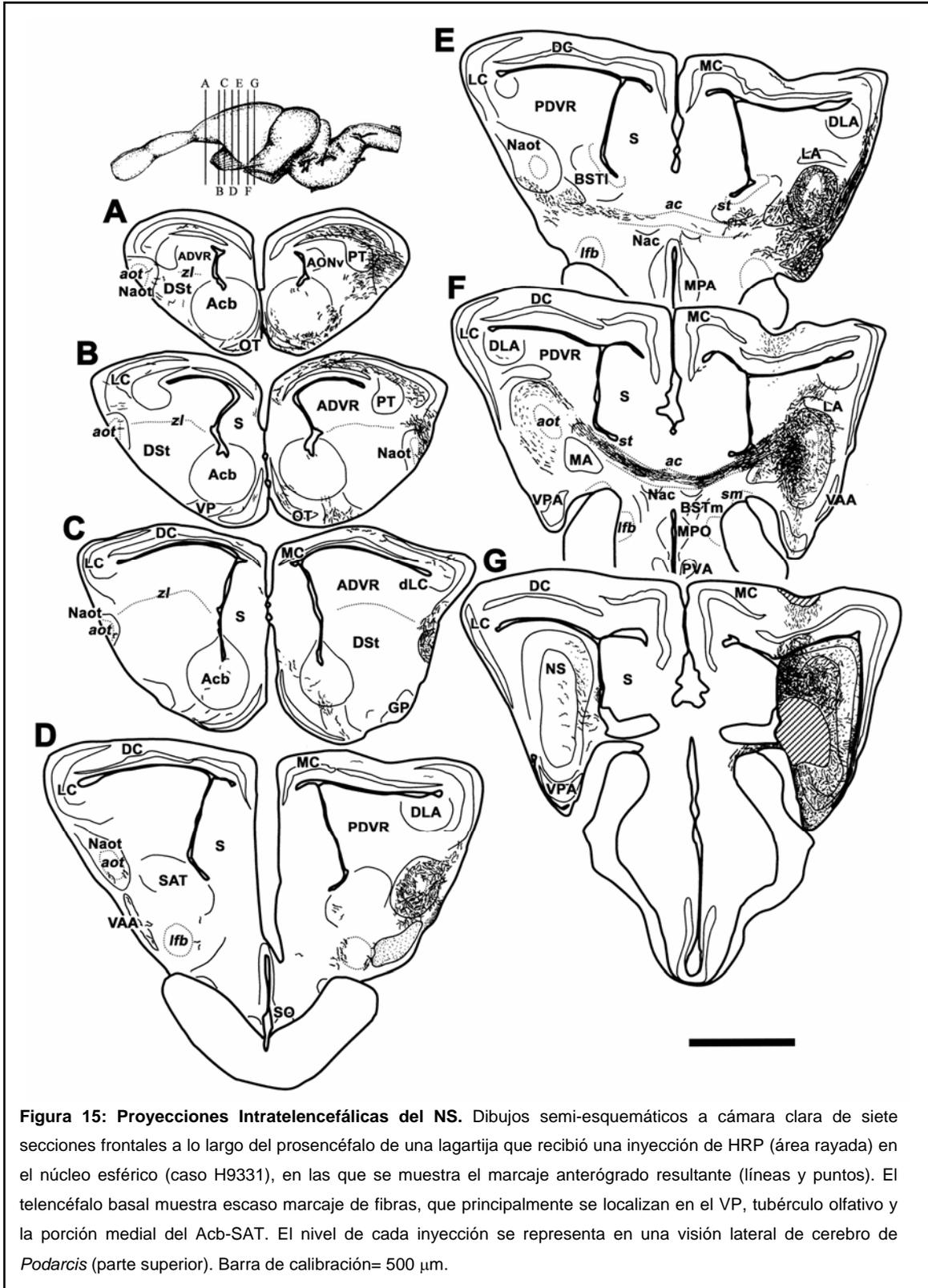
4.2.4.4 Marcaje Anterógrado en el Telencéfalo Basal tras Inyecciones en el NS

En cuatro ocasiones, obtuvimos inyecciones en diferentes porciones del NS. En el caso ilustrado (H9331; Fig. 15) la inyección se localizó en la porción centromedial del núcleo. Desde la inyección, numerosas fibras marcadas entraban en la comisura anterior y daban lugar a un abundante marcaje anterógrado (y retrógrado, no ilustrado) en el NS contralateral, particularmente en su porción medial (Fig. 15G).



**Figura 14: Proyecciones Intratelencefálicas del dLC.** Dibujos a cámara clara de siete secciones frontales del telencéfalo de una lagartija que recibió una inyección de BDA (área rayada) centrada en el dLC (caso B9510). Las fibras marcadas anterógradamente (líneas y puntos) en el hemisferio ipsilateral forman un denso campo terminal en el continuo SAT-Acb, incluyendo las divisiones medial y lateral del SAT, que se extiende hacia el *pallidum*. El telencéfalo basal contralateral muestra un marcaje anterógrado menos denso. El nivel de cada sección se muestra en una visión lateral del cerebro de *Podarcis* (parte superior). Barra de calibración = 500  $\mu\text{m}$ .

También se observó un denso marcaje anterógrado bilateralmente en la amígdala medial (MA), especialmente en su región rostral (Fig. 15E- F), en el BST (Fig. 15F) y en el Naot (Fig. 15D-F). Ipsilateralmente observamos un denso marcaje anterógrado en la amígdala ventral anterior (VAA) y posterior (VPA) (Fig. 15D-F), con unas pocas fibras presentes en la VAA contralateral (Fig. 15D).



**Figura 15: Proyecciones Intratelencefálicas del NS.** Dibujos semi-esquemáticos a cámara clara de siete secciones frontales a lo largo del prosencéfalo de una lagartija que recibió una inyección de HRP (área rayada) en el núcleo esférico (caso H9331), en las que se muestra el marcaje anterógrado resultante (líneas y puntos). El telencéfalo basal muestra escaso marcaje de fibras, que principalmente se localizan en el VP, tubérculo olfativo y la porción medial del Acb-SAT. El nivel de cada inyección se representa en una visión lateral de cerebro de *Podarcis* (parte superior). Barra de calibración= 500  $\mu$ m.

En el telencéfalo ventro-medial el marcaje anterógrado se extendía por el estriado ventral y el pálido ventral. Así, se veían unas cuantas fibras marcadas en el SATm (Fig. 15D), y especialmente en la zona interpuesta entre el Acb ventro-medial (Fig. 15A-C) y el OT (Fig. 15A-B). Desde estas estructuras, algunas fibras se adentraban en el VP (Fig. 15A-C). El marcaje en el estriado ventral y en el VP era bilateral con una fuerte predominancia ipsilateral.

El DSt estaba desprovisto de marcaje fibrilar excepto en sus niveles más rostrales, donde se apreciaban unas pocas fibras que quizás atravesaban el DSt para conectar el campo terminal del Naot con el del estriado ventral (Fig. 15A). Una gran inyección que afectaba a la mayor parte del NS (H8810) mostraba un patrón de marcaje anterógrado similar al descrito. Es destacable el hecho de que mientras que la parte rostral del Acb ipsilateral mostraba una gran densidad de fibras y terminales marcados, el estriado ventral y dorsal contralateral no mostraba marcaje alguno.

### **4.3 DISCUSIÓN**

Las ideas clásicas sobre la organización del telencéfalo de reptiles (Ulinski, 1983) consideran que el estriado está dominado por una proyección topográficamente organizada procedente de la porción anterior de la cresta dorsal ventricular (DVR). Utilizando tanto el trazado anterógrado como el retrógrado, hemos demostrado la presencia de una serie de proyecciones adicionales desde el polo caudal de la DVR a los territorios estriatales, incluyendo el estriado ventral, con una organización diferente (no topográfica).

Nuestros datos sobre la cito y quimioarquitectura del telencéfalo basal, sugieren que la porción caudal de la DVR no sólo proyecta al DSt sino que también lo hace a un continuo de estructuras estriatales ventrales (Acb y SAT) y, menos masivamente, a estructuras palidales. Por lo tanto, parece lógico discutir en primer lugar nuestros datos sobre la organización del telencéfalo basal de *Podarcis* en el contexto de descripciones previas hechas en otras especies de reptiles y de los sólidos datos anatómicos que existen en mamíferos y aves. En segundo lugar, utilizaremos nuestros resultados de los experimentos de trazado anterógrado y retrógrado y datos similares en otros reptiles para definir el lugar de origen y el patrón de terminación de las proyecciones desde la PDVR a los territorios estriatales en reptiles. A continuación, mediante un enfoque comparado,

utilizaremos datos sobre las conexiones y la expresión de genes homeóticos durante el desarrollo embrionario en los territorios paliales caudales de diferentes vertebrados con el objetivo de interpretar las conexiones entre la DVR posterior y el estriado como amígdalo-estriatales. Por último, discutiremos las posibles funciones de estas proyecciones sobre el comportamiento y la importancia que estas deben haber tenido en la evolución del prosencéfalo en los amniotas.

#### **4.3.1 Organización del Telencéfalo Basal de Reptiles**

Nuestra descripción está basada en el esquema general de los hemisferios cerebrales propuesto por Swanson y Risold (1999), y más tarde refinado por Lanuza et al. (2002). De acuerdo con este esquema, el telencéfalo subcortical está compuesto por territorios estriatales y palidales. Esta división está fundamentada en el análisis del desarrollo (origen en las eminencias gangliónicas lateral y medial), así como de los datos anatómicos y neuroquímicos en el adulto.

En este sentido, los territorios estriatales son derivados de la eminencia gangliónica lateral que, en el adulto, están dominados por aferencias glutamatérgicas provenientes del palio, ricas en zinc. Por su parte, las neuronas estriatales GABAérgicas espinosas de tamaño medio proyectan principalmente a territorios palidales/entopedunculares y al tegmento. La tercera característica de los compartimentos estriatales son sus aferencias dopaminérgicas desde los núcleos tegmentales a los que proyectan. Las características hodológicas y neuroquímicas, tales como la presencia de terminales zinc-positivos (de probable origen palial; Pérez-Clausell, 1988; Smeets et al., 1989) y de inervación dopaminérgica (TH) originada en el tegmento, encajan con nuestra propuesta para la delimitación de los territorios estriatales.

En relación con esto, el accumbens de mamíferos recibe un importante proyección desde el córtex subicular (Groenewegen et al., 1987; Brog et al., 1993). Se puede encontrar una proyección comparable en lagartos, que se origina en el córtex mediodorsal caudal y que acaba en el accumbens (Hoogland y Vermeulen-VanderZee, 1989; Guirado et al., 1999; ver Fig. 9F del presente trabajo). Nuestros datos amplían los descubrimientos de Pérez-Santana et al. (1997) que indicaban que el accumbens de reptiles recibe una aferencia adicional y muy importante cuantitativamente desde la porción caudal de la cresta dorsal ventricular. Esta aferencia incluye proyecciones

bilaterales desde porciones profundas del palio lateral, tales como el DLA, y aferencias homolaterales desde el dLC (lateropalial) y la PDVR (ventropalial). Tal y como se ha descrito anteriormente y de acuerdo con la hipótesis propuesta por Bruce y Neary (1995a; 1995b) y Lanuza et al. (1998) acerca de la naturaleza amigdalina de la DVR caudal, estas proyecciones podría representar una vía amígdalo-accumbens similar a la proyección ya descrita desde la amígdala basolateral de mamíferos al núcleo accumbens (Wright et al., 1996). Estas aferencias paliales constituyen un sólido refrendo a la idea de que el Acb de reptiles es el homólogo de su homónimo en mamíferos. Además, las proyecciones desde el núcleo accumbens al pálido ventral y sus interconexiones con grupos celulares dopaminérgicos en el área ventral tegmental, características típicas del estriado ventral de mamíferos (ver Groenewegen et al., 1999), también existen en el Acb de reptiles (gecko: Russchen y Jonker, 1988; Smeets y Medina, 1995; nuestros resultados no publicados en *Podarcis*).

En mamíferos, el Acb presenta dos compartimentos principales, el área periférica (*shell* en la terminología anglosajona) y el área central (*core*), que muestran una expresión diferencial de calbindina, sustancia P, AChasa y TH (ver Jongen-Relo et al., 1994), así como patrones de conexiones distintos (Zahm, 1999). Nuestros datos histoquímicos encajan con la idea propuesta por Guirado et al. (1999) de que el Acb de reptiles también muestra una compartimentación imprecisa que consiste en una porción rostro-medial rica en TH, AChasa y SP, y una parte caudo-lateral, menos reactiva para todos los marcadores. Guirado et al. (1999) sugirieron que el Acb rostro-medial de reptiles se asemejaba al área periférica del Acb de mamíferos y la parte caudo-lateral al área central del Acb. Nuestros datos sobre las conexiones del Acb no contradicen esta hipótesis, ya que, al igual que la amígdala basolateral de mamíferos (Wright et al., 1996, ver capítulo 5), la DVR caudal de reptiles proyecta a ambas divisiones del Acb de una manera compleja.

El DSt de reptiles es comparado, normalmente, con el caudado-putamen de mamíferos. Sin embargo, mientras que el caudado-putamen recibe su principal aferencia desde la isocorteza mediodorsal y temporal, el DSt de reptiles es el blanco de proyecciones descendentes desde la ADVR ventropalial y muestra sólo aferencias menores desde el palio dorsal (Hoogland y Vermeulen VanderZee, 1989). Esto podría explicar las evidentes diferencias entre la organización del DSt de reptiles y el caudado-putamen. No obstante, ambas estructuras comparten tanto una aferencia bilateral y masiva desde estructuras

lateropaliales profundas (amígdala basolateral de mamíferos, Kelley et al., 1982; resultados del capítulo 5 del presente trabajo; DLA de reptiles, este trabajo), como sus interconexiones con la *substantia nigra*. A este respecto, uno de los rasgos principales de la organización intrínseca del estriado dorsal de mamíferos es la organización en estriosomas y matriz (Gerfen, 1992). Aunque el DSt ventro-lateral es denso en la AChasa y TH y el DSt dorsal no expresa estos marcadores tal y como ya discutió Russchen et al. (1987), hoy en día no está claro que esto refleje una organización en estriosomas-matriz. En mamíferos, la matriz proyecta principalmente al pálido y a la *substantia nigra pars reticulata*, pobre en células, mientras que las células localizadas en los estriosomas proyectan fundamentalmente a la *substantia nigra pars compacta*, abundante en células. Se necesitan estudios detallados sobre las proyecciones desde el DSt al pálido y a la *substantia nigra* en reptiles para aclarar esta cuestión.

Por último, el pálido recibe una aferencia no glutamatérgica (GABAérgica y peptidérgica) desde territorios estriatales. La delimitación de los territorios palidales propuesta en este trabajo encaja con estas características ya que todas las estructuras palidales descritas son pobres en terminales Zn-positivos (Pérez-Clausell, 1988) y reciben proyecciones aferentes desde territorios estriatales (Martínez-García y Olucha, 1988 y datos propios no publicados del trazado anterógrado tras inyecciones en el Acb y el DSt). De acuerdo con Swanson y Risold (1999) nosotros proponemos que el pálido está compuesto por tres compartimentos: el pálido medial, que corresponde al denominado núcleo del tracto prosencefálico medial (Nmfb), el pálido ventral (VP) y el pálido lateral (globo pálido, GP). El Nmfb es contiguo al DBN, con el que comparte una importante aferencia desde el septum lateral (Font et al., 1998) y proyecciones ascendentes al córtex mediodorsal hipocámpico (Bruce y Butler, 1984a; Martínez-García y Olucha, 1988). Basándose en estos datos hodológicos y en otras características histoquímicas, Font et al. (1998) propusieron que el Nmfb y el DBN de reptiles constituyen el homólogo del complejo septum medial-banda diagonal del cerebro de mamíferos. El VP es el principal blanco para las proyecciones descendentes del Acb (Russchen y Jonker, 1988; Smeets y Medina, 1995; nuestros resultados sin publicar en *Podarcis*) y muestra características adicionales típicas de territorios palidales, tales como abundantes células AChasa-positivas (colinérgicas, ver Medina et al., 1993) que proyectan al palio (ver Lanuza et al., 2002) y células y fibras sustancia P-positivas (Fig. 7). El globo pálido constituye el principal blanco

de las proyecciones descendentes desde el DSt (Russchen y Jonker, 1988; resultados propios sin publicar). Como su homónimo en mamíferos (Halliday et al., 1995), el GP de *Podarcis* muestra una distribución heterogénea de la sustancia P (Fig. 7) similar a la descrita por Russchen et al. (1987) en el gecko. Aunque esta heterogeneidad encaja con la organización en parches de las aferencias del GP desde los territorios estriatales (ver Russchen y Jonker, 1988), su significación funcional todavía se desconoce.

Uno de los principales descubrimientos de nuestro trabajo concerniente a la organización del telencéfalo basal, es la presencia de conspicuas (aunque moderadas) proyecciones desde territorios paliales a territorios palidales (ver Fig. 11). Esto indica que, en reptiles, como en mamíferos (Naito y Kita, 1994), el pálido no solo es innervado por un *input* masivo estriatal sino que también es el blanco de una proyección cortical de menor entidad.

#### **4.3.2 Proyecciones desde la DVR al Estriado en Reptiles**

Los experimentos de trazado de conexiones mediante lesión-degeneración o de transporte anterógrado de aminoácidos tritizados en diferentes reptiles (serpientes: Ulinski, 1978; *Tupinambis nigropunctatus*: Hoogland, 1977; Voneida y Sligar, 1979; revisado por Ulinski, 1983) sugerían que la DVR daba lugar a proyecciones organizadas topográficamente al estriado dorsal. Estos resultados fueron confirmados en *Gekko gekko* mediante el uso de técnicas modernas de trazado de conexiones (González et al., 1990).

Además, nuestros experimentos, tanto de trazado retrógrado como anterógrado, indican claramente que la porción caudal de la DVR y las estructuras colindantes (núcleo dorsolateral amigdalino, córtex lateral profundo y núcleo esférico) dan lugar a cuatro proyecciones diferentes a los territorios estriatales.

En primer lugar, nuestros resultados proporcionan evidencias de la existencia de una proyección desde el núcleo esférico al núcleo accumbens ipsilateral (y muy ligeramente al Acb contralateral). El trazado retrógrado (ver Fig. 8B y Fig. 9F) marca esta proyección mucho mejor que el transporte anterógrado (Fig. 15). Esto podría deberse a que la proyección es convergente, ya que tras pequeñas inyecciones en el núcleo esférico, sólo unas pocas fibras aparecen marcadas anterógradamente en el Acb, mientras que las inyecciones de dextran-aminas en el Acb dan lugar a un elevado número de células marcadas en el NS.

La segunda proyección se origina en la DVR posterior (PDVR) y acaba masivamente en el continuo de estructuras que conectan el área de transición estriado-amigdalina (SAT) (caudalmente) con el núcleo accumbens (rostralmente) (Fig. 9 A-D).

La tercera proyección, arranca desde el córtex lateral profundo (dLC) y muestra un patrón de terminación similar a la originada en la PDVR. Sin embargo, los resultados del marcaje retrógrado tras inyecciones en el accumbens sugieren que la aferencia desde el dLC es mucho más extensa que la que se origina en la PDVR. Además, el trazado anterógrado (Fig. 11B-E) indica que la proyección desde el dLC al accumbens es bilateral con una clara dominancia ipsilateral.

La última proyección se origina en el núcleo dorsolateral amigdalino (DLA) y termina bilateralmente en todo el estriado, tanto en la división ventral como en la dorsal. Esto ha sido confirmado mediante el transporte anterógrado (Fig. 13) y retrógrado (Fig. 8C y Fig. 9D-F) de los trazadores.

#### **4.3.2.1 Proyecciones Vomeronasales al Estriado: El Olfatoestriado**

La presencia de proyecciones desde el núcleo esférico al estriado ventral ya ha sido descrita en serpientes mediante el estudio de trazado anterógrado ('*olfactostriatum*'; Lanuza y Halpern, 1997) y retrógrado (Pérez-Santana et al., 1997). De este modo, nuestros resultados en lagartijas confirman que la mayoría (sino todos) los reptiles *Squamata* muestran esta proyección. En tortugas, el trazado de las aferencias al accumbens también marca retrógradamente las células superficiales del llamado *nucleus centralis amigdalae* (Figura 1G en Siemen y Kunzle, 1994). Estos datos podrían indicar una aferencia quimiosensorial a partes del estriado ventral, ya que estas células se encuentran justo ventrales a la entrada de información desde los bulbos olfativos (Reiner y Karten, 1985). Es comúnmente aceptado que las tortugas muestran un sistema vomeronasal reducido (si se compara con el de los reptiles *Squamata*), ya que carecen de un núcleo esférico. Sin embargo, existen evidencias de que al menos algunas tortugas terrestres y semiacuáticas presentan un órgano vomeronasal funcional (Hatanaka y Matsuzaki, 1993; Murphy et al., 2001). Es por ello que la presencia de un *input* vomeronasal a partes del estriado ventral podría ser una característica común de los reptiles. En *Podarcis* (nuestros resultados) al igual que ocurre en *Thamnophis* (Lanuza y Halpern, 1997), esta proyección parece acabar en la zona del estriado ventral interpuesta entre el Acb y el OT, justo en la zona que

denominada *olfactostriatum* por Lanuza y Halpern (1997). De hecho, esta zona en *Podarcis* comparte con el olfatoestriado de ofidios la característica de una pobre inervación de fibras TH-inmunoreactivas (Martínez-Marcos et al., 2005).

#### **4.3.2.2 Proyecciones al Continuo SAT-Acb: Amígdala Central Extendida**

El transporte anterógrado de aminoácidos tritiados en la DVR caudal de *Tupinambis nigropunctatus* (Voneida y Sligar, 1979) reveló una proyección desde la DVR posterior al estriado ventral (continuo Acb-SAT). El estudio de las aferencias estriatales del gecko (González et al., 1990) mostró no solo una proyección topográfica desde la DVR al estriado dorsal, sino también una proyección al estriado ventral (ver su Figura 10G-I) que se originaba exclusivamente en la parte caudo-lateral de la DVR. Esta proyección parece terminar en un continuo de estructuras que conecta el SAT (caudalmente) con el Acb (rostralmente), claramente en consonancia con nuestros descubrimientos en *Podarcis*. Además, en serpientes también parece existir una proyección similar, ya que las inyecciones de trazadores en el Acb dan lugar a marcaje retrógrado en la parte caudal de la DVR (Pérez-Santana et al., 1997). En tortugas la porción lateral de la DVR basal proyecta masivamente al estriado ventral (Siemen y Kunzle, 1994). Esto también concuerda con la situación en *Podarcis*, donde las células que proyectan al Acb se encuentran fundamentalmente en la PDVR lateral (Fig. 8C y Fig. 9D-E).

No tenemos conocimiento de que se hayan descrito proyecciones desde el córtex lateral profundo al estriado ventral en otros reptiles *Squamata* además de en *Podarcis*. Esto es sorprendente ya que nuestras inyecciones en el Acb dieron lugar a células marcadas retrógradamente en el espacio entre el surco lateral del ventrículo telencefálico y el córtex lateral ventral de manera consistente (Fig. 8D y Fig. 9C). Igualmente, las inyecciones de trazadores que afectaban al dLC dieron lugar el marcaje de fibras en núcleo accumbens ipsilateral (pero también en menor medida en el accumbens contralateral). Por ello podemos concluir que tal proyección existe en *Podarcis*, aunque se necesitan más estudios para determinar si también está presente en otros reptiles. En tortugas, se encuentran células que proyectan al accumbens en las áreas h y L o profundas a ellas (Siemen y Kunzle, 1994) (áreas adyacentes al córtex lateral), y en el mismo córtex lateral (ventral), pero son necesarios más datos para determinar si estas zonas se corresponden con el dLC de lagartijas.

#### ***4.3.2.3 El DLA: La Principal Fuente de Proyecciones Amígdalo-Estriatales***

Nuestros datos confirman y amplían resultados previos en *Podarcis* (Martínez-García et al., 1993) que indican la existencia de proyecciones masivas y bilaterales desde el DLA tanto al estriado ventral como al dorsal. De los resultados de González y colaboradores se puede inferir una proyección similar en el gecko (González et al., 1990), ya que éstos autores, tras inyectar leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris* en la DVR caudo-lateral, encontraron fibras marcadas anterógradamente tanto en el estriado dorsal como en el ventral (ver su Fig. 6). Sorprendentemente, esta proyección no fue revelada mediante sus experimentos de trazado retrógrado de las aferencias al Acb, mientras que sus inyecciones de trazadores retrógrados en el estriado dorsal, dieron lugar a un marcaje de somas celulares en el núcleo *lateralis* del complejo amigdalino (ver su Fig. 10). Nosotros consideramos que la proyección desde la DVR caudo-lateral, incluyendo el llamado núcleo *lateralis* del complejo amigdalino, al estriado del gecko es equivalente a la proyección desde el núcleo dorsolateral de la amígdala al estriado en *Podarcis*. Si esto es cierto, el DLA de *Podarcis* (y probablemente de otros lacértidos) sería equivalente al núcleo *lateralis* del complejo amigdalino de geckónidos, idea que se ve apoyada por el hecho de que ambas estructuras presentan una densa inervación colinérgica, revelada mediante la inmunocitoquímica para la transferasa de acetilcolina (Hoogland y Vermeulen-VanderZee, 1990; Medina et al., 1993) y la histoquímica para la AChasa (Regidor y Poch, 1988; Lanuza et al., 1997; resultados sin publicar en *Tarentola mauritanica*). Estos datos indican diferencias importantes en la citoarquitectura de la DVR (especialmente de su polo caudal) entre los diferentes grupos de lagartos, diferencias que han entorpecido nuestra comprensión del patrón de organización común de los hemisferios telencefálicos de reptiles.

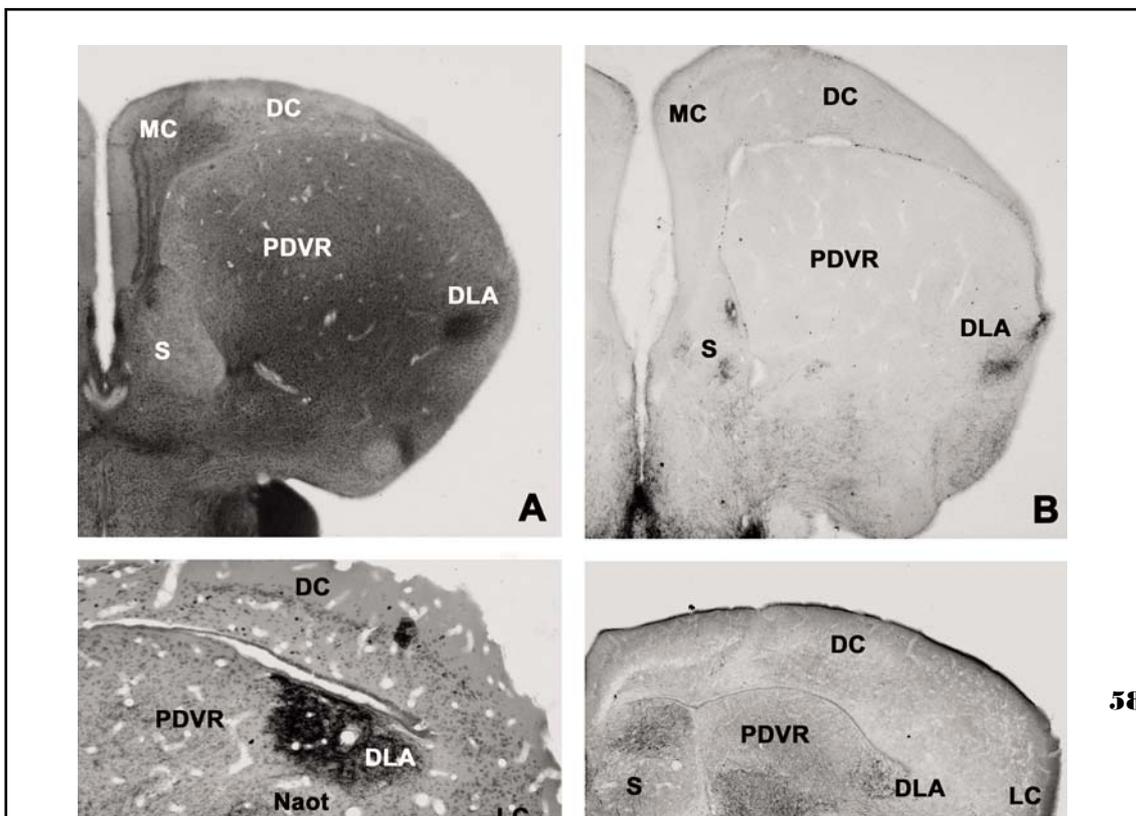
#### ***4.3.2.4 El Sistema Vomeronasal y la Variabilidad en la Organización de la Amígdala Palial de Reptiles***

Algunos de los datos publicados en otros reptiles *Squamata* diferentes a *Podarcis* parecen no encajar demasiado bien con la idea propuesta en este trabajo. Así, por ejemplo, en geckónidos no se han descrito proyecciones masivas desde la amígdala al estriado. Esto, probablemente se debe al hecho de que existen ligeras diferencias en la organización de la amígdala palial más que a la ausencia de estas proyecciones en

geckónidos. Por ejemplo, la fuente principal de proyecciones amígdalo-estriatales en *Podarcis*, el DLA, se puede identificar en otros reptiles por medio de marcadores histoquímicos tal y como se ha indicado anteriormente. Así, los hemisferios cerebrales caudales de geckónidos presentan un área inervada por fibras colinérgicas/Achasa (*Gekko gecko*: Hoogland y Vermeulen-Vanderzee, 1990; *Tarentola mauritanica*: observaciones propias no publicadas) que también muestra una inervación dopaminérgica rica (Smeets et al., 1986). Según estos datos el DLA de lagartos geckónidos parece mostrar una localización relativamente ventral dentro de los hemisferios cerebrales si se compara con el de los lagartos de la familia *Lacertidae* (como *Podarcis* y *Gallotia*).

Estas diferencias en la organización de los hemisferios cerebrales caudales están probablemente relacionadas con las diferencias en el desarrollo del sistema vomeronasal, que viene determinado por el tamaño del NS (mucho más pequeño en geckónidos que en lacértidos. Esta idea se ve apoyada por el descubrimiento de una localización más ventral del área amigdalina inervada por fibras Achasa/TH (probablemente el DLA) en *Anolis carolinensis*, donde el sistema vomeronasal está prácticamente ausente (Fig. 16A-B imágenes obtenidas de nuestra colección de preparaciones).

Por otro lado, si comparamos los datos de lacértidos con los de serpientes, donde el sistema vomeronasal alcanza probablemente su mayor grado de desarrollo, también se observan diferencias evidentes. Estas hacen referencia a la presencia de proyecciones desde el DLA al hipotálamo en serpientes (Martínez-Marcos et al., 1999b).



Aunque esto puede reflejar diferencias reales entre lagartos y serpientes, también puede deberse a diferencias en la definición del DLA de serpientes y de lagartos. De hecho, la estructura denominada DLA por Martínez-Marcos et al. (1999b, ver su Fig. 1) no parece profunda al córtex lateral (por ello lateropalial), sino que parece un grupo celular interpuesto entre la PDVR y el LA, localizado al lado del NS (y por ello muy probablemente ventropalial). A este respecto, es interesante resaltar que las células del DLA que proyectan a territorios estriatales (al olfatoestriado) en *Thamnophis sirtalis* (ver Fig. 7C y Fig. 8C en Martínez-Marcos et al., 2005) ocupan una posición claramente más rostral que aquellas que proyectan al hipotálamo. En relación a esto, el estudio de la distribución de Achasa y TH revela inervaciones catecolaminérgicas y colinérgicas convergentes (Fig. 16C-D, imágenes cedidas por el Dr. Alino Martínez-Marcos) de un grupo celular que, aparentemente, muestra una localización similar a la de las células que proyectan al olfatoestriado (Martínez-Marcos et al., 2005) pero que es claramente rostral a la localización de las células que proyectan al hipotálamo (Martínez-Marcos et al., 1999b). Por todo esto, parece que si el DLA de serpientes se define adecuadamente mediante el uso de marcadores histoquímicos fiables, este consiste en un grupo celular que proyecta bilateralmente al estriado, pero no al hipotálamo. Esta interpretación también podría ser

válida para algunos datos ya publicados en lagartos de la familia *Teiidae* (*Varanus* y *Tupinambis*; Hoogland, 1977; Voneida y Sligar, 1979).

Aunque los datos en cocodrilos y en tortugas son escasos, en general concuerdan con la idea que proponemos. Por ejemplo, en tortugas, la región de la DVR posterior muestra un patrón similar de *inputs* talámicos multimodales (Belekhova y Chkheidze, 1992) y aferencias sensoriales intratelencefálicas (ADVR-PDVR) (Belekhova y Chkheidze, 1991; Chkheidze y Belekhova, 1992). Además, la región posterior de la DVR de tortugas también muestra proyecciones abundantes al estriado (Siemen y Kunzle, 1994) comparables a las descritas en lagartijas en este trabajo. Además, existen evidencias de la existencia de proyecciones masivas al hipotálamo desde los hemisferios cerebrales caudales (PDVR y la llamada DVR basal) en tortugas (ver Figura 9 en Cordery y Molnar, 1999).

En cuanto al grupo de los cocodrilos, Pritz y Stritzel (1992) describieron una proyección a la DVR posterior en el caimán desde un grupo celular talámico en los alrededores del relevo auditivo, el núcleo reuniens *pars diffusa*. Tal y como se discute en detalle en Lanuza et al. (1998), este grupo celular parece parte del tálamo posterior multimodal, sugiriendo también una naturaleza amigdalina para la PDVR y áreas adyacentes en cocodrilos. Además, en los hemisferios cerebrales caudales del caimán (Brauth y Kitt, 1980) hay una zona densamente reactiva para la Achasa que incluye el NLOT y el límite lateral de la DVR caudal, que proyecta al estriado, hecho que recuerda al DLA. Se necesitan, datos acerca de la anatomía de los hemisferios cerebrales de cocodrilos, sobre todo, porque representan los parientes vivos más cercanos de los reptiles ancestrales que dieron lugar a las aves (Whetstone y Martin, 1979). De hecho, el estudio de la distribución de la GFAP (proteína ácida fibrilar de la glía) revela una organización similar de los hemisferios cerebrales de cocodrilos (Kalman y Pritz, 2001) y de pollos (Kalman et al., 1998) que puede ser muy útil a la hora de entender la evolución de la amígdala.

#### ***4.3.2.5 Las Proyecciones Amigdalinas al Estriado y al Hipotálamo están Segregadas***

Nuestros resultados indican que la PDVR y las estructuras adyacentes en el telencéfalo de los lagartos, dan lugar a dos grupos de proyecciones eferentes, como son, la que va al estriado ventral (este trabajo) y la que va al hipotálamo ventromedial (Lanuza et

al., 1997). Es interesante indicar que los grupos celulares que dan lugar a estos dos sistemas eferentes están parcialmente segregados, ya que, mientras que las proyecciones al hipotálamo ventromedial se originan en la PDVR medial y la LA (Lanuza et al., 1997), las proyecciones al Acb se originan fundamentalmente en la PDVR lateral y el DLA (ver resultados). Sin embargo, las inyecciones que afectan a partes del SAT daban un marcaje retrógrado relativamente denso en la PDVR medial y la LA (ver resultados). Por todo esto, la PDVR medial y la LA parecen proyectar tanto al SAT como al hipotálamo. Esto sugiere que el sistema de eferencias al hipotálamo y al SAT están funcionalmente unidos (e.g., en la expresión de miedo; ver Implicaciones Funcionales).

### **4.3.3 Significado Comparado de la DVR y su Parcelación**

La DVR anterior es el blanco de las proyecciones ascendentes desde los núcleos talámicos que relevan información auditiva (tálamo medial/núcleo reuniens), somatosensorial (núcleos talámico posterior medial y postero-central) y visual (núcleo rotundo) (Karten, 1969; Karten et al., 1973; Lohman y van Woerden-Verkley, 1978; Ulinski, 1983; Bruce y Butler, 1984b), y además origina proyecciones al estriado dorsal. La conclusión que se extrae de estos resultados es que la vía DVR-estriado constituye el nexo de unión entre los sistemas sensoriales y el sistema motor y, por lo tanto, es el sustrato anatómico de la integración sensorimotora en el prosencéfalo de reptiles. Ésta es la principal razón por la que se compara a este sistema con la proyección (neo)cortico-estriatal del cerebro de mamíferos. Como se ha expuesto en la introducción, esta idea se ha puesto seriamente en cuestión recientemente. Por un lado, la DVR de reptiles es un derivado del palio ventral embrionario (quizás con una parte lateropalial como ocurre en aves; Smith-Fernández et al., 1998; Puellas et al., 2000). Por tanto, no puede ser homóloga del neocórtex, ya que éste es un derivado del palio dorsal. Además, la DVR está compuesta por dos divisiones rostro-caudales con diferente significado funcional. La DVR anterior (ADVR) consiste, aparentemente, de áreas sensoriales unimodales (ver Ulinski, 1983) incluyendo varios campos visuales (Guirado et al., 2000; Manger et al., 2002). Su significado comparado es incierto, aunque se ha sugerido una posible homología entre la ADVR de reptiles y el núcleo lateral de la amígdala de mamíferos (Bruce y Neary, 1995b). En este caso, la ADVR sería un núcleo lateral hiperdesarrollado en reptiles. La otra posible alternativa que también respetaría los datos de la expresión de genes homeóticos sería la propuesta por Striedter (1995), en la que la ADVR sería homóloga del núcleo

endopiriforme de mamíferos. Ambas posibilidades se argumentan en el capítulo de la Discusión General.

Por otro lado, la DVR posterior (PDVR) parece ser una estructura asociativa, ya que recibe proyecciones convergentes desde los campos sensoriales de la ADVR (Andreu et al., 1996). Como se ha propuesto en distintos puntos de esta tesis, los datos sobre las aferencias intratelencefálicas (Belekhova y Chkheidze, 1991; Andreu et al., 1996; Lanuza et al., 1998) y extratelencefálicas a la PDVR (Lanuza et al., 1998), así como los de sus proyecciones al hipotálamo (Bruce y Neary, 1995a; Lanuza et al., 1997) sugieren que esta estructura es parte de la amígdala basolateral de reptiles (Martínez-García et al., 2002a). En este contexto, los resultados discutidos arriba indicarían la existencia en reptiles de proyecciones importantes desde la amígdala basolateral a territorios estriatales que tendrían su homólogo en el cerebro de mamíferos (y en el de aves), como se argumenta en la Discusión General.

# Capítulo 5

ESTUDIO DE LAS  
PROYECCIONES  
AMÍGDALO-ESTRIATALES  
EN *Mus musculus*

## INTRODUCCIÓN

La amígdala es una estructura anatómicamente compleja, compuesta de derivados paliales y subpaliales (Puelles et al., 2000; Martínez-García et al., 2007a). Desde un punto de vista funcional, la amígdala también parece heterogénea. Esto condujo a Swanson y Petrovich (1998) a cuestionarse seriamente el concepto de amígdala. De hecho, la amígdala palial está formada por estructuras superficiales y laminadas, llamadas núcleos corticales amigdalinos y por núcleos profundos sin laminación que incluyen a la división basolateral de la amígdala y al área amígdalo-hipocámpica. Por otra parte, debido a sus aferencias directas de los bulbos olfativos (Scalia y Winans, 1975; Shipley et al., 2004), los núcleos de la amígdala cortical son considerados como parte de los sistemas olfativo y vomeronasal. Sin embargo la amígdala basolateral recibe un patrón complejo de *inputs* unimodales y multimodales desde diferentes áreas del córtex y de la formación hipocámpica, así como de diversos núcleos del tálamo, hipotálamo y tronco del encéfalo (McDonald, 1998; Pitkänen, 2000). Existen fuertes evidencias en favor de un papel de la amígdala basolateral en la expresión de comportamientos emocionales y en el aprendizaje emocional (Davis, 1994; LeDoux, 2000; Baxter y Murray, 2002). Por todo ello, la amígdala palial parece una mezcla de estructuras que está implicada en funciones, aparentemente, sin relación alguna, tales como la quimiosensibilidad y el aprendizaje emocional.

El papel quimiosensorial de la amígdala no ha recibido demasiada atención (ver Aggleton, 2000), y muchos de los estudios sobre la función amigdalina están centrados en los circuitos y las relaciones sinápticas que median la adquisición y la expresión de miedo (e.g. Pitkänen et al., 1997; Maren y Quirk, 2004). Según estos estudios, las respuestas de miedo-ansiedad están mediadas por las proyecciones descendentes de la amígdala central y del núcleo de la *stria terminalis* (LeDoux et al., 1988; Walker et al., 2003). Sin embargo, las evidencias sobre el papel de la amígdala en los procesos relacionados con el refuerzo, incluido el aprendizaje, son cada vez mayores (Baxter y Murray, 2002; Everitt et al., 2003). Los estudios pioneros del grupo de Everitt (Cador et al., 1989; Everitt et al., 1989; 1991; Robbins et al., 1989) ya indicaban que las vías desde la amígdala al estriado ventral (núcleo accumbens) constituyen el sustrato anatómico de su papel en el refuerzo. Además, la amígdala es, junto con el neocórtex, la estructura telencefálica que presenta

proyecciones más masivas al estriado dorsal. Se sabe que la proyección amígdalo-estriatal dorsal participa en la modulación de ciertos tipos de memoria (Packard y Teather, 1998) en función de cambios en la magnitud del refuerzo (Salinas y White, 1998).

A pesar de la existencia de estos datos funcionales, los estudios de la anatomía de las proyecciones amígdalo-estriatales se restringen a ratas, gatos y monos (Kelley et al., 1982; Russchen y Price, 1984; Russchen et al., 1985; Price et al., 1987; McDonald, 1991a; 1991b; Wright et al., 1996; Fudge et al., 2002; Fudge et al., 2004), mientras que, hasta donde sabemos, estas vías no han sido nunca estudiadas en ratones. Además, la mayoría de esos estudios se han centrado en las proyecciones que se originan en la amígdala basolateral y que inervan al núcleo accumbens. Por contra, existe mucha menos información acerca de las proyecciones desde la amígdala cortical al estriado (McDonald, 1991b; Canteras et al., 1992; Shammah-Lagnado y Santiago, 1999), o sobre las proyecciones amigdalinas a otros territorios del estriado ventral, como el tubérculo olfativo, los puentes celulares del estriado ventral y los islotes de Calleja (Newman y Winans, 1980; Fallon, 1983). Por otra parte, nuestros conocimientos sobre la anatomía de las proyecciones amigdalinas al caudado-putamen se basan en la descripción somera de Kelley et al., (1982) y de McDonald (1991b), y en estudios de las eferencias de algunos núcleos de la amígdala (Petrovich et al., 1996). Falta, por lo tanto, un análisis exhaustivo del origen y terminación de las distintas proyecciones desde la amígdala al estriado. Por todo ello, el objetivo de este capítulo es el de proporcionar una descripción detallada de las proyecciones desde los centros de la amígdala palial (cortical y profunda) a los territorios estriatales.

Como especie experimental hemos escogido el ratón, una especie que si bien es muy utilizada en estudios sobre las relaciones entre cerebro y comportamiento debido a las ventajas del uso de animales modificados genéticamente, ha recibido relativamente poca atención por parte de los estudiosos de la anatomía del cerebro, particularmente en lo que se refiere a conexiones neurales. Además, y dado que la amígdala palial incluye importantes centros quimiosensoriales, los resultados de este estudio pueden ayudar a entender las vías neurales que median las respuestas comportamentales a señales químicas, incluyendo las procedentes de conoespecíficos (feromonas y olores asociados). En este sentido, nuestros resultados aportan luz a la actual discusión sobre la organización

funcional de la amígdala, a saber, si la amígdala es una unidad anatómica y funcional o una colección arbitraria de núcleos.

## 5.2 RESULTADOS

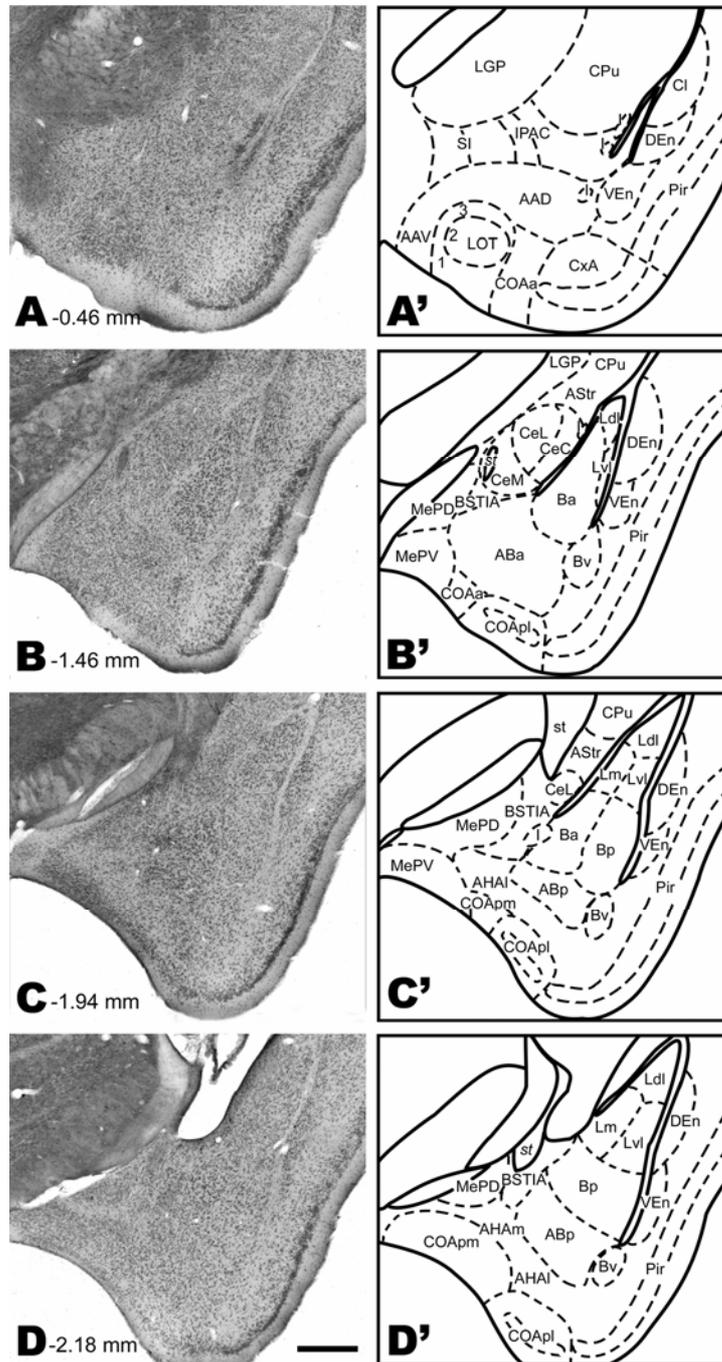
Siguiendo con el diseño experimental descrito en el capítulo anterior, como primer paso para estudiar las proyecciones amígdalo-estriatales en el ratón estudiamos el marcaje retrógrado presente en la amígdala palial tras la inyección de trazadores anatómicos en diferentes regiones del estriado (ventral y dorsal). A continuación, se describe detalladamente el marcaje anterógrado encontrado en los territorios estriatales después de la inyección de trazadores en diversas áreas de la amígdala palial.

Para describir los resultados de estos experimentos, hemos seguido la nomenclatura utilizada por Paxinos y Franklin (2001), excepto para la amígdala, en donde hemos adaptado parcialmente al cerebro del ratón la nomenclatura utilizada por Pitkänen (2000) en la rata (ver abajo). De acuerdo a Paxinos y Franklin (2001), en el núcleo accumbens identificamos dos regiones, el área central (*core*, AcbC) y el área periférica (*shell*, AcbSh, con sus subdivisiones lateral y medial; LAcbSh y MAcbSh respectivamente), aunque no consideramos el área periférica más rostral como una tercera subdivisión de la misma, sino como parte de su subdivisión medial. Por otra parte, tras las inyecciones en la amígdala palial, el marcaje anterógrado en el núcleo accumbens presentaba una clara continuidad con el encontrado en el tubérculo olfativo (Tu) y los islotes de Calleja (ICj) a través de los puentes celulares (CB) que unen estas estructuras a través del pálido ventral (para descripciones previas de los puentes celulares estriatales ver Seifert et al., 1998; Riedel et al., 2002). Por consiguiente, todas estas estructuras fueron incluidas en nuestra descripción de las proyecciones amigdalinas al estriado ventral. Además, para facilitar el análisis del marcaje en el caudado-putamen (CPu) dividimos dicha estructura en 5 niveles rostro-caudales. El nivel 1 o pre-comisural rostral abarcaba desde el inicio del CPu hasta que aparece el *genu* del cuerpo calloso (coordenadas desde Bregma: de +1.70 a +1.18 mm). El nivel 2 o pre-comisural caudal comienza con el cruce del cuerpo calloso y acaba antes del cruce de parte anterior de la comisura anterior (*aca*; coordenadas desde Bregma: de +1.10 a +0.38 mm). El nivel 3 o nivel comisural se inicia cuando el *aca* cruza los dos hemisferios y finaliza cuando ésta desaparece lateralmente (coordenadas desde Bregma: de +0.26 a -0.46 mm). El nivel 4 o post-comisural rostral abarca desde el inicio el Ba hasta el

final del MeA (coordenadas desde Bregma: de -0.58 a -1.22 mm). Por último, el nivel 5 o nivel post-comisural caudal se inicia con la aparición de las dos subdivisiones ventrodorsales del núcleo medial de la amígdala (Me) y acaba con el final del CPu (coordenadas desde Bregma: de -1.34 a -2.30 mm).

### 5.2.1 Arquitectura de la Amígdala del Ratón (Fig. 17)

La amígdala es una mezcla de estructuras paliales y subpaliales (Puelles et al., 2000). La amígdala palial se compone de dos divisiones. La división cortical está compuesta de estructuras superficiales y olfato-receptoras, que muestran una organización laminar. Topológicamente profundas a estas estructuras se encuentran una serie de grupos celulares con configuración nuclear, que constituyen la división profunda (o basolateral) de la amígdala. La amígdala cortical se compone del núcleo del tracto olfativo lateral (LOT, Fig. 17A-A'), del núcleo cortical anterior amigdalino (COAa, Fig. 17A-A', B-B') y del núcleo cortical posterolateral amigdalino (COApl, Fig. 17B-B', C-C', D-D'), así como de dos centros vomeronasales secundarios, el núcleo del tracto olfativo accesorio (BAOT, sin ilustrar) y el núcleo cortical posteromedial amigdalino (COApm, Fig. 17C-C', D-D'). Además, hay diversas áreas de transición interpuestas entre la amígdala cortical y el córtex piriforme, tales como la zona de transición cortico-amigdalina (CxA, Fig. 17A-A') y el área de transición amígdalo-piriforme (APir, sin ilustrar). La amígdala palial profunda está compuesta por los núcleos basal (B, o basolateral, Fig. 17B-B', C-C', D-D'), basal accesorio (AB, o basomedial, Fig. 17B-B', C-C', D-D') y lateral (L, Fig. 17B-B', C-C', D-D') amigdalinos (conocidos conjuntamente como la división basolateral de la amígdala), así como por el área amígdalo-hipocámpica (AHA Fig. 17C-C', D-D') y quizás la porción dorsal del área anterior amigdalina (AA, Fig. 17A-A'). De acuerdo con Paxinos y Franklin (2001), consideramos que el B incluye una división anterior (Ba, Fig. 17B-B', C-C'), una división posterior (Bp, Fig. 17C-C', D-D') y una división ventral (Bv, Fig. 17B-B', C-C', D-D'). En el AB distinguimos una porción anterior (ABa, Fig. 17B-B') y una posterior (ABp, Fig. 17C-C', D-D'). El L muestra una división



**Figura 17: Citoarquitectura del Complejo Amigdalino del Ratón.** Secciones frontales de la amígdala del ratón teñidas con Nissl (columna izquierda, **A** rostral, **D** caudal), en las que se indica el nivel antero-posterior relativo a Bregma de acuerdo con Paxinos y Franklin (2001). En la columna derecha, dibujos esquemáticos de las mismas secciones en donde se han trazado los límites de los diferentes grupos celulares y tractos fibrilares. Barra de calibración= 400  $\mu$ m.

ventrolateral (Lvl, Fig. 17B-B', C-C', D-D'), una dorsolateral (Ldl, Fig. 17B-B', C-C', D-D') y una medial (Lm, Fig. 17C-C', D-D'). Finalmente, dentro del AHA consideramos un subnúcleo medial (AHAm, Fig. 17D-D') y uno lateral (AHA1, Fig. 17C-C', D-D').

### **5.2.2 Marcaje Retrógrado en la Amígdala Palial del Ratón tras Inyecciones en el Estriado**

Se realizaron un total de veinte inyecciones en el estriado ventral y dorsal. El marcaje retrógrado obtenido tras estas inyecciones se describe a continuación.

#### **5.2.2.1 Inyecciones en el Estriado Ventral**

En doce ocasiones conseguimos realizar inyecciones de trazadores en el núcleo accumbens (Acb), de las cuales describimos detalladamente ocho casos representativos (Fig. 18A). De estos ocho casos, dos presentaban inyecciones restringidas al área periférica medial del Acb, una se localizó en el área periférica lateral, tres inyecciones estaban circunscritas al área central del núcleo, y dos más afectaban a pequeñas porciones de las áreas periférica y central del núcleo del Acb (ver Tabla 1). Además en una ocasión realizamos una inyección que afectó al ICjM (Tabla 1). El marcaje retrógrado resultante de las inyecciones en el estriado ventral se describe a continuación.

##### **5.2.2.1.1 Inyecciones en el Área Periférica (*shell*) del Núcleo Accumbens**

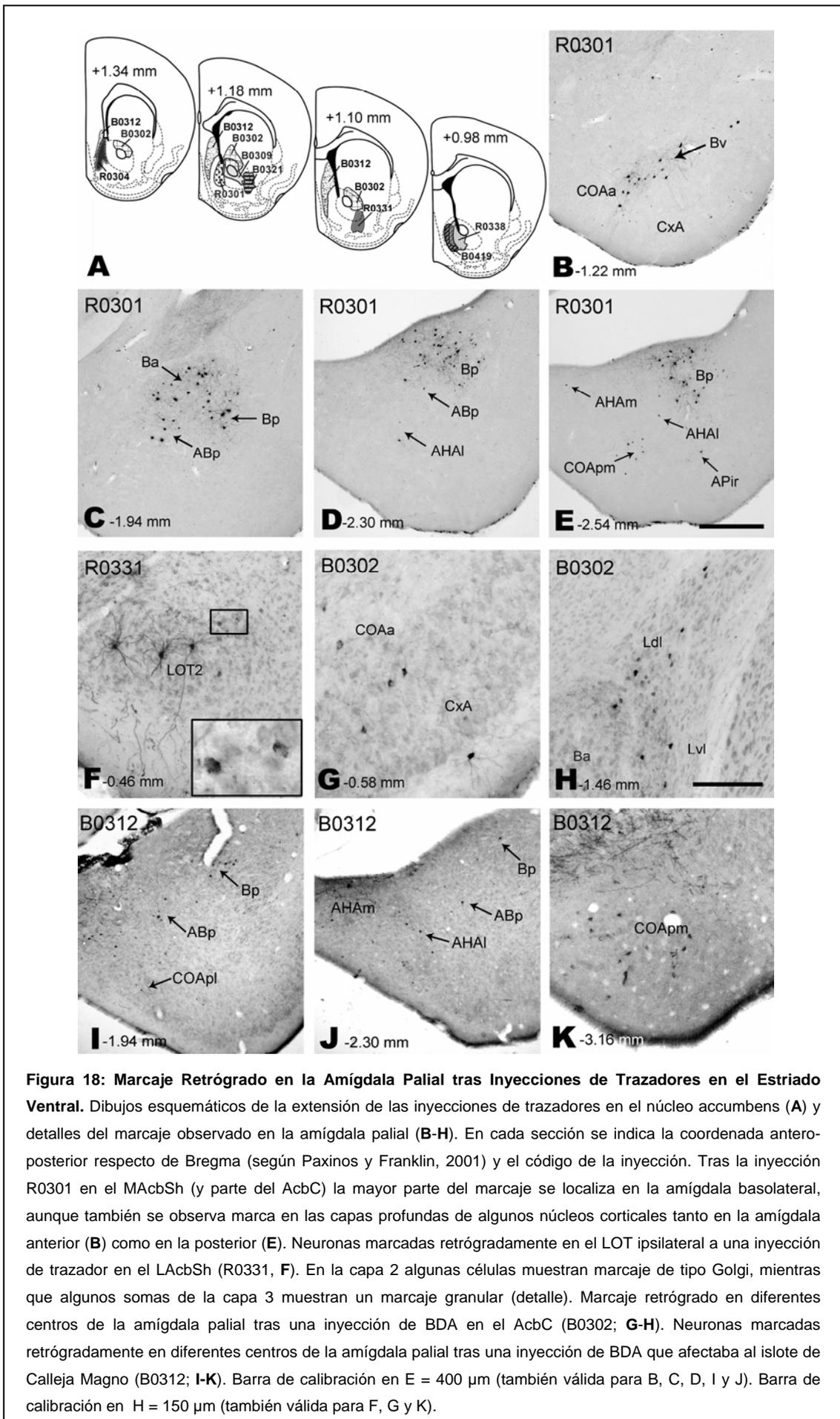
Las inyecciones que abarcaban el MAcbSh dieron lugar a marcaje retrógrado tanto en la amígdala cortical como en la profunda (ver Tabla 1). Tras estas inyecciones (Fig. 18A), la amígdala cortical presentaba unas pocas células marcadas en el límite profundo y lateral entre el COAa y la CxA (Fig. 18B) y en el APir caudal (Fig. 18E). Las inyecciones que incluían el extremo rostral del MAcbSh (R0304 y R0301) mostraban unas pocas neuronas marcadas en el COApm profundo (Tabla 1; Fig. 18E). En la amígdala palial profunda el marcaje retrógrado era profuso en todo el B. Así, se encontró marcaje en un área ventral al Ba y profunda a la CxA y al COAa, que consideramos perteneciente al Bv (Fig. 18B). Además, la porción caudal del Ba (Fig. 18C) y todo el Bp (Fig. 18E) mostraban abundante marcaje retrógrado. La inyección más rostral en el MAcbSh (R0304), así como aquellas inyecciones que afectaban tanto al MAcbSh como al

**Tabla 1: Marca Retrógrada en la Amígdala Palial tras Inyecciones en el Estriado Ventral:** Marcaje retrógrado en diferentes áreas de la amígdala (columnas) tras inyecciones en el estriado ventral (filas) cuantificados subjetivamente de acuerdo con las puntuaciones siguientes: - ausente; X, escaso; XX, moderado; XXX, denso; B, marcaje bilateral. En cada caso, se indica la extensión rostro-caudal del lugar de inyección (coordenadas desde Bregma).

		AMÍGDALA CORTICAL						AMÍGDALA PALIAL PROFUNDA									
		COApm	LOT	COAa	CxA	COApI	APir	Ba	Bp	Bv	ABa	ABp	AHAi	AHAM	Lm	Lvi	Ldl
Área Periférica del Acb	R0304 MAcbSh +1.34 mm	X	-	X	-	-	X	XX	XXX B	XX	-	X	X	X	-	-	-
	B0419 MAcbSh +0.98 mm	-	-	X	-	-	X	XXX	XXX	XX	-	XX	X	X	-	-	-
	R0331 LAcbSh +1.10 mm	-	XX	X	XX	-	X	XXX B	XX	XX	-	XX	X	-	-	XX	-
Área Central del Acb	B0302 AcbC de +1.34 a +1.10 mm	X	X B	X	X	-	-	XX B	X	XX B	-	XXX B	X B	-	-	X	XXX B
	B0309 AcbC dorsomedial +1.18 mm	-	X	-	X	-	-	X	X	-	-	X	-	-	-	-	X
	B0321 lateral AcbC +1.18 mm	-	X	-	-	-	-	XX	X	X	-	X	-	-	-	X	XX
Inyecciones no restringidas	R0301 MAcbSh (+AcbC medial) +1.18 mm	X	-	X	-	-	X	XX	XXX B	XX	-	X B	X	X	-	X	-
	R0338 MAcbSh dorsal + AcbC +0.98 mm	X	X	X	-	X	X	XX	XX B	XX	-	XX B	X B	XX	X	X	X
B0312 S lateral + ICjM de +1.34 a +1.10 mm		XXX	X B	X B	X	X	-	X	XX	-	XX B	X	XX	XX	-	X	-

AcbC (R0301 y R0338), dieron, además, marcaje retrógrado en el Bp contralateral (Tabla 1). Finalmente, en el AB se encontraron neuronas marcadas retrógradamente en su porción posterior (ABp; Fig. 18C-D), donde el marcaje era bilateral en las inyecciones que abarcaban el MAcbSh y el AcbC (ver Tabla 1). También se observaron unas pocas células marcadas en el AHA medial y lateral (Tabla 1; Fig. 18D-E). Por contra, en aquellas inyecciones restringidas al MAcbSh no se observaban células marcadas en el L (Tabla 1).

La inyección en el AcbSh lateral (LAcbSh; R0331, Fig. 18A) dio lugar a numerosas células marcadas retrógradamente en diversos centros paliales de la amígdala. En la amígdala cortical, encontramos abundantes somas marcadas en la CxA y en escaso número en el COAa (ver Tabla 1). A estos niveles rostrales, el LOT mostraba células con un marcaje de tipo Golgi (árbol dendrítico completo) en la capa 2 (Fig. 18F), así como una densidad de moderada a alta de cuerpos celulares levemente marcados en la capa 3 (ver detalle en la Fig. 18F). A niveles caudales, en el APir pudimos observar unos pocos somas con marcaje retrógrado granular (no ilustrado). En la amígdala palial profunda, encontramos abundantes



**Figura 18: Marcaje Retrógado en la Amígdala Palial tras Inyecciones de Trazadores en el Estriado Ventral.** Dibujos esquemáticos de la extensión de las inyecciones de trazadores en el núcleo accumbens (A) y detalles del marcaje observado en la amígdala palial (B-H). En cada sección se indica la coordenada antero-posterior respecto de Bregma (según Paxinos y Franklin, 2001) y el código de la inyección. Tras la inyección R0301 en el MAcbSh (y parte del AcbC) la mayor parte del marcaje se localiza en la amígdala basolateral, aunque también se observa marca en las capas profundas de algunos núcleos corticales tanto en la amígdala anterior (B) como en la posterior (E). Neuronas marcadas retrógadamente en el LOT ipsilateral a una inyección de trazador en el LAcbSh (R0331, F). En la capa 2 algunas células muestran marcaje de tipo Golgi, mientras que algunos somas de la capa 3 muestran un marcaje granular (detalle). Marcaje retrógado en diferentes centros de la amígdala palial tras una inyección de BDA en el AcbC (B0302; G-H). Neuronas marcadas retrógadamente en diferentes centros de la amígdala palial tras una inyección de BDA que afectaba al islote de Calleja Magno (B0312; I-K). Barra de calibración en E = 400  $\mu$ m (también válida para B, C, D, I y J). Barra de calibración en H = 150  $\mu$ m (también válida para F, G y K).

células marcadas en todos los subnúcleos del B, especialmente en el Ba, en donde el marcaje era bilateral (con clara dominancia ipsilateral; Tabla 1). El ABp también mostraba una densidad entre moderada y alta de neuronas marcadas retrógradamente (Tabla 1). En el AHA no se observó marcaje en el AHAm, mientras que el AHAl presentaba pocas células marcadas (Tabla 1). Finalmente, el L mostraba una población moderadamente densa de neuronas marcadas confinada al polo rostral de la subdivisión ventrolateral (Tabla 1).

#### 5.2.2.1.2 Inyecciones en el Área Central (core) del Núcleo Accumbens

Las inyecciones de trazadores anatómicos en el AcbC (Tabla 1) incluían dos inyecciones pequeñas restringidas a diferentes porciones del AcbC, que mostraban pocas células marcadas retrógradamente, y una inyección grande (B0302) que abarcaba la mayor parte del AcbC dorsal además de una pequeña porción del caudado-putamen adyacente (Fig. 18A). En la amígdala cortical, encontramos unas pocas células marcadas en la capa 3 del LOT bilateralmente (Tabla 1) y en la CxA homolateral, especialmente en su porción profunda junto al COAa (Fig. 18G). Además la parte más profunda del COApm a niveles intermedios también mostraba marcaje (no se muestra). Por otro lado, en las estructuras que componen la amígdala palial profunda, se observó una densa población de células marcadas retrógradamente en el L, en su porción más anterior, en el Lvl y especialmente en el Ldl (Tabla 1; Fig. 18H), donde el marcaje era bilateral. Además, en ambos hemisferios pudimos observar muchas neuronas marcadas retrógradamente en la región caudal del Ba (Fig. 18H) y en el Bv así como unas pocas neuronas en la región más rostral del Bp (sin ilustrar). Por su parte, el ABp y la AHAl mostraban una gran densidad de células retrógradamente marcadas (Tabla 1).

El resto de inyecciones en el Acb no estaban circunscritas únicamente a una parte del núcleo, pero el marcaje retrógrado que mostraban era consistente con el descrito arriba para las inyecciones más pequeñas y restringidas. Los resultados de las inyecciones no restringidas (inyecciones R0301 y R0338) se muestran en la Tabla 1.

#### 5.2.2.1.3 Inyección en el Islote de Calleja Magno

Además de estas inyecciones en el AcbC y AcbSh, obtuvimos una inyección centrada en el septum lateral (B0312), en la que la única estructura del estriado ventral era el ICjM (Fig. 18A). Esta inyección dio lugar a numerosas células marcadas retrógradamente en diversos centros paliales de la amígdala (Tabla 1). Con excepción del APir, toda la amígdala palial cortical presentaba marca retrógrada (Tabla 1), siendo el COApm el núcleo que presentaba una mayor densidad de neuronas marcadas que se encontraban tanto en posiciones profundas como superficiales, sobre todo en niveles caudales (Fig. 18K). En el COApl se observaron algunas neuronas marcadas en su extremo más rostral y profundo (Fig. 18I). Tanto el COAa superficial como el CxA medial presentaban algunas células marcadas retrógradamente (Tabla 1). En el COAa contralateral se observaba la misma marca retrógrada (Tabla 1). En el LOT y en ambos hemisferios habían algunas células con marca granular en la capa 2 (no mostrado). En la amígdala palial profunda encontramos alguna neurona en el extremo ventral y caudal del Ba y un número moderado de neuronas marcadas en el polo rostral del Bp (Fig. 18I). El AB presentaba células marcadas en la región ventral del ABA más caudal, marca que también se observó en el hemisferio contralateral, y en el ABp (Tabla 1, Fig. 18I-J). En el AHA el número de neuronas marcadas era moderado en ambas subdivisiones (Fig. 18J). Por último el Lvl presentaba alguna neurona con marca granular (Tabla 1).

### 5.2.2.2 Inyecciones en el Caudado-Putamen (Estriado Dorsal)

En siete ocasiones realizamos inyecciones de trazadores en el caudado-putamen, de las cuales describimos detalladamente cinco casos representativos (Fig. 19). De estos cinco casos (Tabla 2), uno presentaba una inyección en el CPu antero-medial (nivel 1 del CPu) y el resto presentaban inyecciones en diferentes porciones del CPu ventro-lateral. En dos de estos casos las inyecciones estaban circunscritas al CPu ventro-lateral en los niveles 2 y 3, en uno la inyección se centraba en el nivel 4 del CPu ventro-lateral y en el último la inyección se localizaban en los niveles 2 y 3 del CPu ventro-lateral pero también afectaban al núcleo intersticial de la rama posterior de la comisura anterior (IPAC). En todos los casos el CPu y el neocórtex situados por encima de la inyección fueron afectados por el tracto de la pipeta.



La inyección en el CPu antero-medial (B0439) se localizaba en la región más rostral del CPu (nivel 1) y ocupaba predominantemente la mitad medial de esta estructura (ver Fig. 19). El tracto de la pipeta también dejó marca en el cuerpo caloso. Tras esta inyección, aunque sí se observaban células marcadas en zonas como el neocórtex, apenas se observaba marca retrógrada en la amígdala palial, siendo el Ba el único núcleo en el que aparecían neuronas marcadas (Tabla 2). Esta marca se localizaba

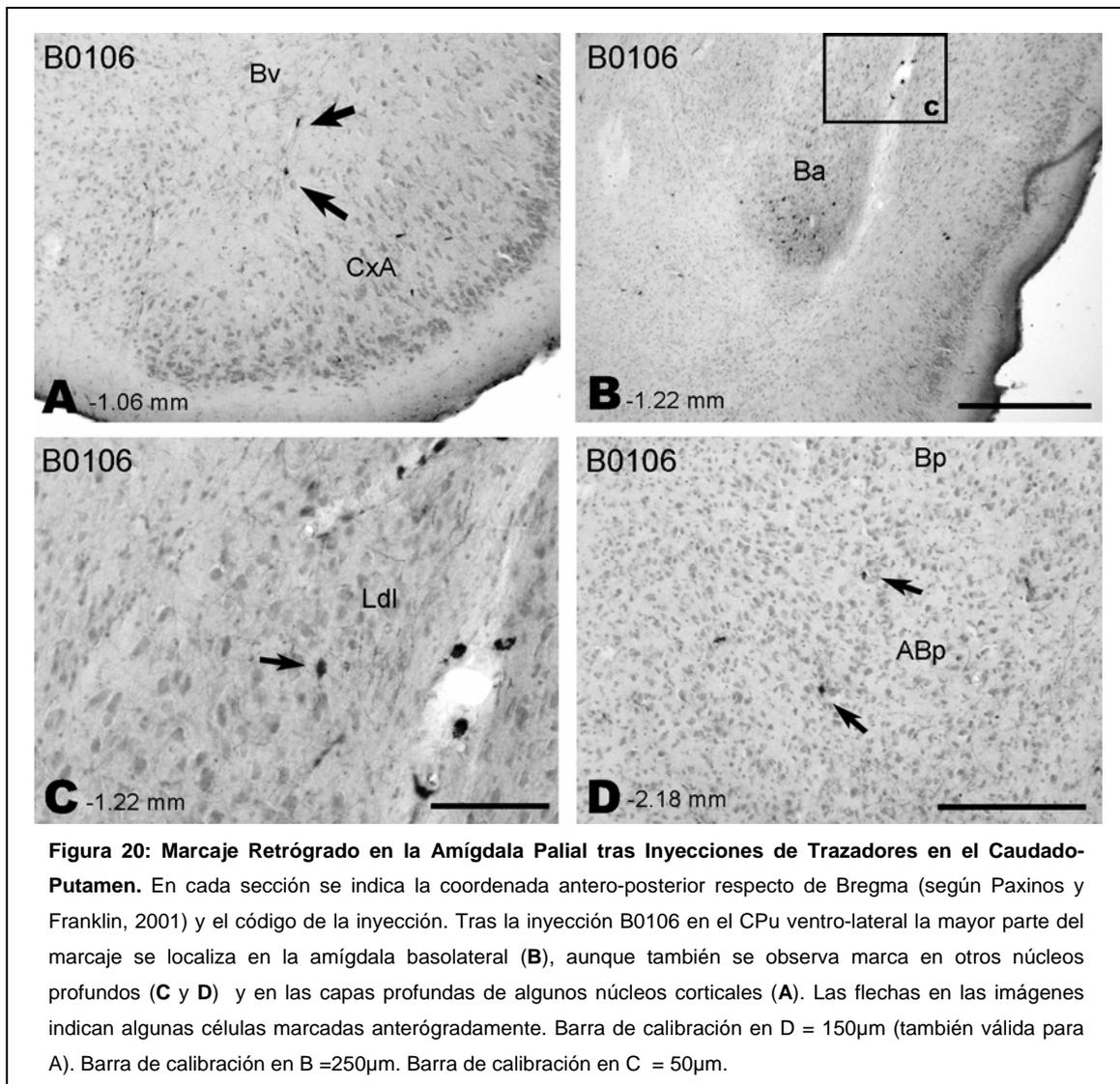
en unos pocos somas situados en un nivel rostro-caudal intermedio y de la región lateral del núcleo.

**Tabla 2: Marca Retrógrada en la Amígdala Palial tras Inyecciones en el Estriado Dorsal:** Marcaje retrógrado en diferentes áreas de la amígdala (columnas) tras inyecciones en el estriado dorsal (filas) cuantificados subjetivamente de acuerdo con las puntuaciones siguientes: - ausente; X, escaso; XX, moderado; XXX, denso; XXXX, muy denso; B, marcaje bilateral. En cada caso, se indica la extensión rostro-caudal del lugar de inyección (coordenadas desde Bregma).

	AMÍGDALA CORTICAL						AMÍGDALA PALIAL PROFUNDA									
	COApm	LOT	COAa	CxA	COApI	APir	Ba	Bp	Bv	ABa	ABp	AHAI	AHAM	Lm	Lvl	Ldl
<b>B0439</b> CPu anteromedial (nivel pre-comisural rostral) de +1.70 a +1.18 mm	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>B0106</b> CPu ventro-lateral (niveles pre-comisural caudal y comisural) de +0.62 a -0.22 mm	-	X B	-	X	-	-	XXX B	-	X B	-	X B	-	-	-	-	X
<b>B0333</b> CPu ventro-lateral (nivel pre-comisural caudal ) de +0.86 a +0.50 mm	-	XX	-	X	-	-	XXX B	-	XX B	-	X B	-	-	-	-	X
<b>B0115</b> CPu ventro-lateral (nivel post-comisural rostral) de -0.46 a -0.70mm	-	-	-	X	-	X	XX	XX	X	X	X	X	-	-	-	X
<b>B0105</b> CPu ventro-lateral (+IPAC+LSS+ac+LGP) (niveles pre-comisural caudal y comisural) de +1.18 a -0.10 mm	-	X B	-	X	X B	XX B	XXXX B	XXX	XXX B	XX B	XX B	-	-	XX	X	XX B

Las inyecciones restringidas al cuadrante ventro-lateral del CPu en los niveles 2 y 3 incluían una inyección grande que ocupaba la mayor parte del CPu ventro-lateral (B0106) y una inyección localizada en una zona de transición entre el CPu y el LAcbSh más caudal (B0333, Fig. 19; Tabla 2). En la amígdala cortical aparecían algunas neuronas marcadas retrógradamente en la CxA, profundas a la capa celular (Fig. 20A) y en la capa 2 del LOT, en la porción más profunda. El marcaje en el LOT era bilateral únicamente en el caso de la inyección más grande (B0106; Tabla 2). En cuanto a la amígdala palial profunda la mayor densidad de células marcadas se encontraba en el B (Tabla 2). Así, se encontró un número considerable de neuronas marcadas en las regiones más rostrales del Ba, con cierta tendencia a situarse en las zonas más laterales del núcleo (Fig. 20B;) y en el Bv, donde se encontraron algunas células justo en el límite con la CxA y COAa (Fig. 20A). En ambos casos la marca era bilateral (Tabla 2). El ABp mostraba alguna neurona

marcada retrógradamente en su porción rostral y profunda (Fig. 20D), encontrándose también marca bilateral (Tabla 2). Por último, el L mostraba alguna neurona marcada



confinada al polo rostral de la subdivisión dorsolateral (Fig. 20C; Tabla 2).

La inyección en el CPu ventro-lateral en el nivel 4 de la estructura (B0115; ver Fig. 19) dio lugar a marcaje retrógrado en diversos centros paliales de la amígdala (Tabla 2). En la amígdala cortical aparecían algunas neuronas marcadas retrógradamente en la CxA, profundas a la capa celular y en las porciones más rostrales del APir (Tabla 2). En la amígdala paliar profunda, encontramos una densidad moderada de células marcadas en todos los subnúcleos del B, especialmente en el Ba y el Bp caudo-lateral (Tabla 2). El AB presentaba neuronas marcadas retrógradamente en la porción caudal del ABa y en la porción rostral del ABp (Tabla 2). Se observó alguna célula marcada en el AHA1 más

caudal (Tabla 2). Finalmente el L mostraba alguna neurona marcada en el polo rostral de la subdivisión dorsolateral (Tabla 2).

El marcaje retrógrado de una inyección más grande en los niveles 2 y 3 del CPU que no estaba circunscrita únicamente a esta estructura (B0105), sino que afectaba igualmente al IPAC, se muestra en la Tabla 2 y como puede apreciarse el marcaje es consistente con el descrito arriba para las inyecciones más restringidas.

### **5.2.3 Transporte Anterógrado desde Inyecciones en la Amígdala Palial del Ratón**

En total realizamos 13 inyecciones en la amígdala palial del ratón. A continuación se describe el marcaje anterógrado en el estriado (ver Tablas 3-5; Figuras 21-27).

#### **5.2.3.1 Marcaje Anterógrado en el Estriado tras Inyecciones en la Amígdala Cortical**

Tres inyecciones quedaron confinadas a la porción cortical de la amígdala, dos de las cuales estaban centradas en la amígdala cortical caudal mientras que la última abarcaba la CxA rostral y el COAa (Fig. 21A).

##### **5.2.3.1.1 Inyecciones en el Núcleo Cortical Posterior**

Las inyecciones B0415 y R0341 afectaban, en diferente grado, al COApm y al COApl. Así, mientras que el caso B0415 era una inyección grande de BDA centrada en el COApm pero que abarcaba a la parte más medial del COApl, la inyección R0341 se restringió prácticamente al COApl, si bien afectaba ligeramente a la parte más lateral del COApm (Fig. 21A). En ambos casos, el tracto de la pipeta marcó unas pocas células en el ABp caudal y el AHA1. En las dos inyecciones, se observaban fibras marcadas que conectaban el lugar de inyección con los campos terminales en el Acb intermedio-caudal y el Tu cursando a través de dos vías diferentes, la *st* y el *ansa peduncularis* que atraviesa el IPAC en el que se observaba un campo terminal marcado.

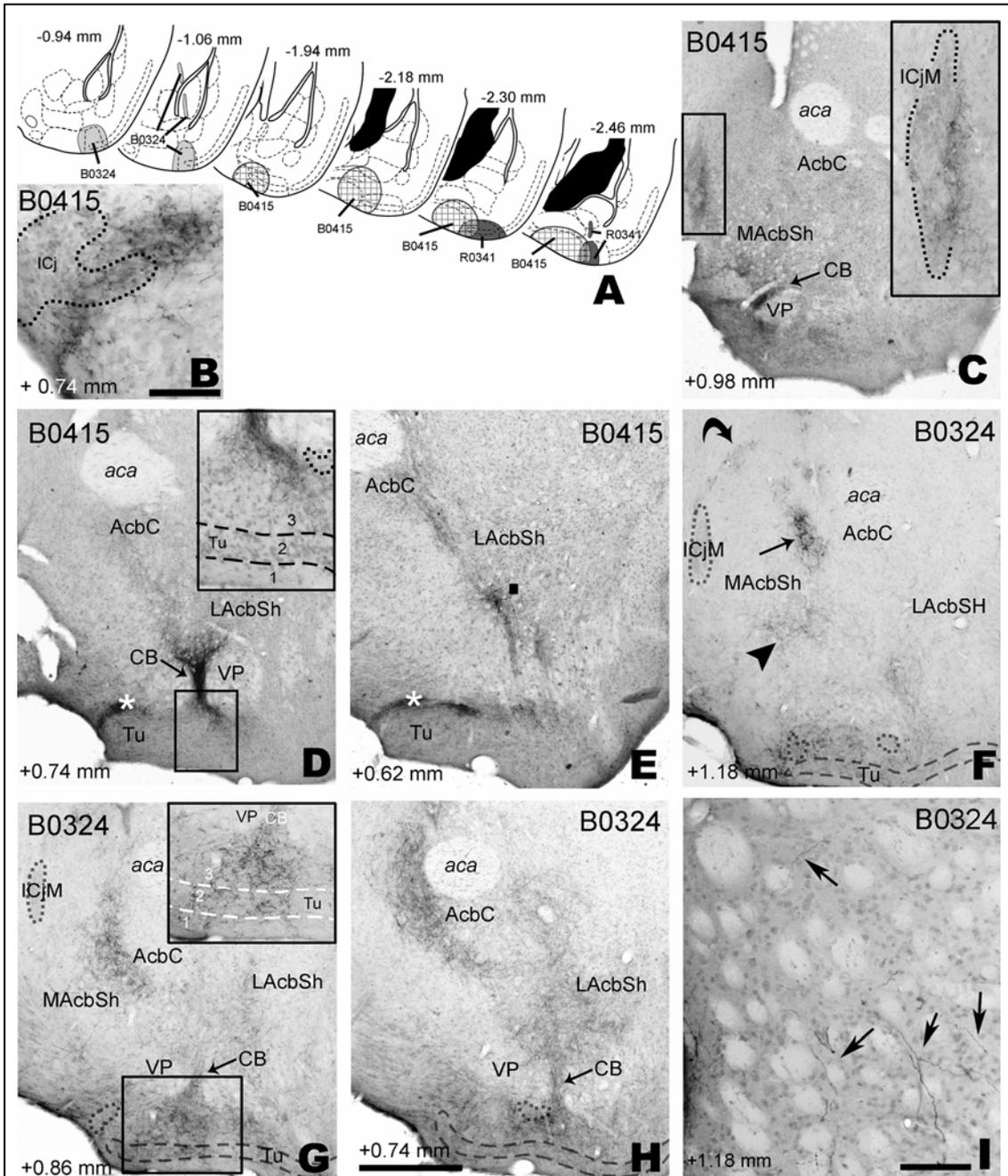
En la inyección centrada en el COApm (B0415), el AcbC caudal mostraba unas pocas fibras marcadas que se localizaban en su porción ventral (Fig. 21D-E). Por contra, en la inyección R0341 (centrada en el COApl), el AcbC caudal mostraba escasas fibras marcadas en su porción medial (ver el patrón de cuadros en la Fig. 21A). Por su parte, ambas inyecciones mostraban un patrón de marcaje similar en el área periférica del Acb consistente en conspicuos campos terminales en el LAcbSh caudal (Fig. 21E), y en

porciones del MAcbSh ventral adyacentes a los puentes celulares del estriado ventral (CB, Fig. 21C). Este último marcaje era ligeramente menos denso en la inyección R0341 (Tabla 3).

**Tabla 3: Inyecciones en la Amígdala Palial. Marca Anterógrada en el Núcleo Accumbens:** Evaluación subjetiva de la densidad del marcaje anterógrado encontrado en tres niveles rostro-caudales de las áreas central (*core*) y periférica (*shell*) del núcleo accumbens (columnas) tras diferentes inyecciones en la amígdala cortical y la amígdala palial profunda (filas). Se indica la extensión rostro-caudal (coordenadas desde Bregma) de cada inyección. La densidad relativa se indica tal y como sigue: - sin marca; /, muy pocas fibras; X, pocas fibras; XX densidad moderada; XXX campo terminal denso; XXXX campo terminal muy denso; XXXXX campo terminal extremadamente denso; B, marcaje contralateral conspicuo; b, escaso marcaje contralateral. Para las abreviaturas, ver la lista.

		MAcbSh			LAcSh			AcCB		
		rostral de +1.78 a +1.54mm	intermedio de +1.42 a +1.18mm	caudal de +1.10 a +0.86mm	rostral de +1.34 a +1.18mm	intermedio de +1.10 a +0.98mm	caudal de +0.86 a +0.74mm	rostral de +1.94 a +1.70mm	intermedio de +1.54 a +1.34mm	caudal de +1.18 a +0.98mm
AMÍGDALA CORTICAL	R0341 COApl de -2.30 a -2.46 mm	-	/	/ b	-	/	X b	-	/	X b
	B0415 COApm de -1.94 a -2.46 mm	-	/ b	/ b	-	/ b	XX b	-	/ b	X b
	B0324 CxA (+ COAa) de -0.94 a -1.06mm	X	XX B	XX b	X	XX	XX b	X b	X b	XX B
AMÍGDALA PALIAL PROFUNDA	B0310 Ba de -1.06 a -1.82mm	XXXX	XXX b	XX b	XXX B	XXX B	XXX B	XXXX B	XXX b	XXX b
	B0336 Bp de -1.94 a -2.70mm	/	XX	XX	/	X	XX b	XX	XXX b	XX B
	R0336 Bp de -2.30 a -2.70mm	X	XXX b	XXX B	/	X	XX b	XX	XXX B	XXXX B
	B0311 ABa de -0.58 a -0.82mm	/	X	XX b	/	/ b	X B	/	/ B	X B
	R0324 ABp -1.82mm	X	XX	XX b	X b	X B	XX B	XX b	XX	XX
	R0335 ABp -2.18mm		XXX B	XXX B	XX b	XX B	XXX B	XXX B	XXX B	XXX B
	R0311 AHAl de -1.82 a -1.94mm	/	X b	XX B	/	X	X B	/	X b	XX B
	R0305 Lvl -1.82mm	XX B	XX B	X B	XX B	XXX B	XXX B	XXX B	XXX B	XXX B
	R0330 Lvl (+ Ldl + CPu) -1.70mm	XX B	XX B	XXX B	X B	XX B	XX B	XXX B	XXX B	XXX B
	B0334 Lvl(+ Ldl + Lm + AStr) de -1.70 a -2.30mm	X	X	XX b	/	X	X b	X	XX b	XXX b

De hecho, tras estas inyecciones los campos terminales más densos en el estriado ventral se localizaban en algunos de los CB (Fig. 21C-D) y en algunas regiones del Tu caudo-medial adyacentes a ellos, si bien, como en el MAcbSh, las fibras marcadas en esta zona del estriado ventral eran más densas en la inyección centrada en el COApm (B0415) que en la centrada en el COApl (R0341). En el Tu la mayoría del marcaje anterógrado aparecía en la capa 3 (ver detalle en Fig. 21D) estrechamente asociado con los islotes de Calleja dorsales a él (ICj; Fig. 21B y asterisco blanco en Fig. 21D-E). Igualmente observamos un campo terminal



**Figura 21: Marcaje Anterógrado en el Estriado tras Inyecciones de Trazadores en la Amígdala Cortical.** Dibujos de la extensión de las inyecciones de trazadores en la amígdala cortical (A) y fotografías del marcaje resultante en el estriado ventral (B-H) y dorsal (I). En cada sección se indica la coordenada antero-posterior respecto a Bregma y el código de la inyección. Microfotografía a gran aumento del marcaje anterógrado en un islote de Calleja (B) y marcaje anterógrado en el estriado ventral encontrado tras una inyección de trazador en el COApm (B0415; C-E). El asterisco blanco en D-E indica un denso campo terminal marcado en el Tu caudo-medial y los ICj adyacentes. El cuadrado negro en E indica la llegada de las fibras que cursan por el *asna peduncularis*. El detalle en C muestra el entramado de fibras marcadas adosadas a la parte medial del ICjM. El marcaje en los CB se extiende a la capa 3 del Tu (detalle en D). Secciones frontales del estriado ventral de un ratón que recibió una inyección de BDA en la CxA (B0324), que muestran el marcaje anterógrado resultante (F-H). Las tres flechas en F señalan los tres principales campos terminales en el MAcbSh. El marcaje en el Tu ocupa las capas 2 y 3 pero también invade la parte más profunda de la capa 1 (detalle en G). El marcaje en el estriado dorsal ocupa la porción yuxtaventricular y adyacente al AcbC (I). Las flechas en I señalan algunas fibras marcadas anterógradamente en el CPu. Barra de calibración en B = 50  $\mu$ m (también válida para I). Barra de calibración en H = 400  $\mu$ m (también válida para C, D, E, F y G).

relativamente denso asociado a la parte medial del islote de Calleja magno (ICjM, ver detalle en Fig. 21C). En resumen, las inyecciones que afectaban a la amígdala cortical caudal daban un marcaje anterógrado prominente en los CB y en los islotes de Calleja, incluido el ICjM (Tabla 4).

**Tabla 4: Marca Anterógrada en el resto de Compartimentos del Estriado Ventral tras Inyecciones en la Amígdala Palial:** Evaluación subjetiva de la densidad del marcaje anterógrado encontrado en tres niveles rostro-caudales del tubérculo olfativo (Tu; se indican las coordenadas antero-posteriores relativas a Bregma), los puentes celulares del estriado ventral (CB) y en asociación con los islotes de Calleja (ICj) y el islote de Calleja magno (ICjM) (columnas), tras diferentes inyecciones en la amígdala cortical y la amígdala palial profunda (filas). Para cada inyección se indica la extensión rostro-caudal (coordenadas desde Bregma). La densidad del marcaje se puntúa de acuerdo con el siguiente código: -, sin marca; /, muy pocas fibras; X, pocas fibras; XX, densidad moderada; XXX, campo terminal denso; XXXX, campo terminal muy denso; XXXXX, campo terminal extremadamente denso; B, marcaje contralateral conspicuo; b, escaso marcaje contralateral.

		Tu			CB	ICj	ICjM
		rostral de +1.98 a +1.42mm	intermedio de +1.34 a +0.74mm	caudal de +0.62 a +0.02mm			
AMÍGDALA CORTICAL	<b>R0341</b> COApl de -2.30 a -2.46 mm	/	X b	XX b	XX b	XX	X
	<b>B0415</b> COApm de -1.94 a -2.46 mm	X	XX B	XXX b	XXX B	XXX B	XXX B
	<b>B0324</b> CxA (+COAa) de -0.94 a -1.06mm	XX	XX b	XXX b	XXX b	/	/
AMÍGDALA PALIAL PROFUNDA	<b>B0310</b> Ba de -1.06 a -1.82mm	XXXXX B	XXXXX B	XXX B	XXXXX B	X B	/
	<b>B0336</b> Bp de -1.94 a -2.70mm	XX b	XXX B	XX B	XX b	X	/
	<b>R0336</b> Bp de -2.30 a -2.70mm	XX b	XXX B	XX B	XXX B	X b	X b
	<b>B0311</b> ABa de -0.98 a -0.82mm	X b	X b	X b	XX b	X b	X b
	<b>R0324</b> ABp -1.82mm	XX B	XX B	XX B	XX B	/ b	-
	<b>R0335</b> ABp -2.18mm	XXX B	XXX B	XXX B	XXX B	X b	/ b
	<b>R0311</b> AHAi de -1.82 a -1.94mm	X b	XX B	XX B	X B	XX b	XX B
	<b>R0305</b> Lvl -1.82mm	XXX B	XXX B	XXX B	XXX B	X B	/
	<b>R0330</b> Lvl (+ Ldl + CPu) -1.70mm	XXX B	XX B	XX B	XXX B	X B	/
	<b>B0334</b> Lvl(+ Ldl + Lm + AStr) de -1.70 a -2.30mm	/	X	X	X	/	/

Aunque con mucha menor densidad, el estriado ventral contralateral mostraba una distribución de marcaje anterógrado similar al ipsilateral a la inyección (Tablas 3-4). El marcaje contralateral probablemente se debía a un fascículo compacto de fibras que cursaba dorsalmente en la parte posterior de la comisura anterior (*acp*) y que aparecía netamente marcado en la inyección B0415 (centrada en el COApm).

En el CPu, el marcaje anterógrado era inexistente en el caso de la inyección R0341 (localizada en el COApl) y muy escaso en el caso de la inyección centrada en el COApm (B0415) encontrándose algunas pocas fibras marcadas en la mitad ventral de la estructura y a niveles del CPu post-comisural rostral. Este marcaje podría deberse a que algunas células en el ABp se vieron afectadas por la inyección (ver Tabla 5).

5.2.3.1.2 Inyección en el Núcleo Cortical Anterior/Zona de Transición Córtico-Amigdalina

La inyección B0324 estaba centrada en la parte caudal de la CxA y en el extremo lateral del COAa (Fig. 21A), pero en la trayectoria de la pipeta también se marcaron algunas células en el extremo anterior del Ba y la transición amígdalo-estriatal (AStr). Se podían seguir fibras marcadas desde el lugar de inyección hasta el estriado dorsal y a lo largo de la *st* hasta el estriado ventral. Además, había fibras marcadas en el *ansa peduncularis* que, tras recorrer la IPAC y la *substantia innominata* (SI) en donde daban marcaje terminal, también contribuían al marcaje en el LAcSh y en el AcbC caudal.

**Tabla 5: Marca Anterógrada en el Estriado Dorsal tras Inyecciones en la Amígdala Paliar:** Evaluación subjetiva de la densidad del marcaje anterógrado encontrado en seis niveles rostro-caudales del caudado-putamen tras diferentes inyecciones en la amígdala cortical y la amígdala paliar profunda (filas), para las que se indica la extensión rostro-caudal (coordenadas desde Bregma). La densidad relativa se indica tal y como sigue: - sin marca; /, muy pocas fibras; X, pocas fibras; XX densidad moderada; XXX campo terminal denso; XXXX campo terminal muy denso; XXXXX campo terminal extremadamente denso; B, marcaje contralateral conspicuo; b, escaso marcaje contralateral.

		CPu (pre-comisural)		CPu (comisural) de +0.26 a -0.46 mm	CPu (post-comisural)	
		rostral de +1.70 a +1.18 mm	caudal de +1.10 a +0.38 mm		rostral de -0.58 a -1.22 mm	caudal de -1.34 a -2.30 mm
AMÍGDALA CORTICAL	R0341 COApl de -2.30 a -2.46 mm	-	-	-	-	-
	B0415 COApm de -1.94 a -2.46 mm	-	-	/	/	/
	B0324 CxA (+COAa) de -0.94 a -1.06mm	/	X	X	X b	X b
AMÍGDALA PALIAR PROFUNDA	B0310 Ba de -1.06 a -1.82mm	XXX B	XXXX B	XXXXX B	XXXXX B	XXXX B
	B0336 Bp de -1.94 a -2.70mm	/	X B	X B	XX B	X B
	R0336 Bp de -2.30 a -2.70mm	X	X b	X b	XX b	XX
	B0311 ABa de -0.58 a -0.82mm	/	X	/	X B	X
	R0324 ABp -1.82mm	XX B	XXX B	XXX B	XXXX B	XXXX B
	R0335 ABp -2.18mm	XX B	XXX B	XXX B	XXXX B	XXXX B
	R0311 AHA1 de -1.82 a -1.94mm	-	-	-	-	-
	R0305 Lvl -1.82mm	XX B	XXX B	XXX B	XXX B	XX B
	R0330 Lvl (+ Ldl + CPu) -1.70mm	XX B	XXX B	XX B	XXX B	XXX b
	B0334 Lvl(+ Ldl + Lm + AStr) de -1.70 a -2.30mm	-	XX	XX	XXX	XXXX

A diferencia de las inyecciones en el núcleo cortical posterior, en este caso se encontraba un marcaje anterógrado conspicuo a lo largo de todo el eje antero-posterior del Acb, incluyendo su extremo más rostral (Tabla 3) que incluso alcanzaba la división medial del núcleo olfativo anterior (no ilustrado). Así, el AcbC mostraba un campo terminal marcado medialmente, que era especialmente denso a niveles caudales y que se extendía ventralmente a medida que uno continuaba hacia adelante, hasta alcanzar el límite con el MAcbSh (Fig. 21G-H). Por otra parte, el AcbC ventro-lateral mostraba un marcaje anterógrado menos denso, que parecía continuo con el campo terminal encontrado en el LAcbSh (ver abajo; Fig. 21H).

En el MAcbSh el marcaje formaba tres campos terminales importantes, el más denso de los cuales se localizaba a niveles intermedios en el límite con el AcbC (ver la flecha negra y recta en la Fig. 21F). En segundo lugar, el límite entre el MAcbSh y el septum lateral rostral estaba ocupado por un pequeño grupo de fibras marcadas (flecha negra y curva en la Fig. 21F). Finalmente, a niveles medio-rostrales, la porción ventral del MAcbSh estaba ocupada por un campo terminal denso que parecía continuo con el marcaje en el Tu medial (ver punta de flecha negra en la Fig. 21F). El LAcbSh mostraba un campo terminal denso que ocupaba la mayor parte de su mitad caudal y se extendía hacia los CB y el Tu caudo-lateral adyacentes (Fig. 21G-H). Por lo tanto, el marcaje anterógrado no estaba restringido a la porción medial del Tu, sino que abarcaba toda su extensión medio-lateral. En esta inyección, el marcaje anterógrado en el Tu era denso en las tres capas (tal vez ligeramente más denso en la capa 3; ver detalle en la Fig. 21G), pero no mostraba una evidente asociación con los ICj (incluido el ICjM, ver Tabla 4).

En el CPu, se encontraban algunas fibras marcadas en la mitad ventral del CPu más rostral, marcaje que parecía tener una continuidad con el encontrado en AcbC y el BST más rostral (niveles pre-comisurales Fig. 21I, y comisural) y una densidad baja de marcaje fibrilar en los niveles del CPu post-comisurales, en toda su extensión (Tabla 5).

En este caso, el marcaje en el Acb, el Tu y los CB y en CPu era bilateral con una clara dominancia ipsilateral (ver Tablas 3-5, más evidente en el caso del MAcbSh y el AcbC caudal). En este sentido, observamos fibras marcadas que cruzaban la línea media a través de la *acp* pero estas no formaban fascículos conspicuos. Además, la marca anterógrada en el hemisferio contralateral era simétrica.

### 5.2.3.2 Marcaje Anterógrado en el Estriado tras Inyecciones en la Amígdala Profunda

Realizamos 10 inyecciones en la amígdala palial profunda (Tablas 3-5; Figuras 22-27), de las cuales tres estaban restringidas al B, tres estaban localizadas en el AB, una en el AHAl y las últimas tres inyecciones estaban circunscritas al L.

#### 5.2.3.2.1 Inyección en el Núcleo Basal Anterior

La inyección B0310 estaba confinada a la parte medial del Ba, si bien la trayectoria de la micropipeta marcó algunas células en el extremo anterior del AStr (Fig. 22). Desde el lugar de inyección, un fascículo de fibras gruesas marcadas entraba en la st, por donde cursaba hasta el Acb. Otro grupo de fibras marcadas cursaba por el *ansa peduncularis* (a través del IPAC y la SI) y parecía conectar con el marcaje en el LAcbSh caudal. Además, algunas fibras marcadas abandonaban el lugar de inyección y cursaban rostralmente a través del fascículo longitudinal asociativo para inervar el LOT. Este marcaje se extendía aún más para acabar en un denso campo terminal en el Tu (Fig. 22B-C). Por último, desde el lugar de inyección algunas fibras adoptaban una dirección ascendente y rostral y alcanzaban el CPu.

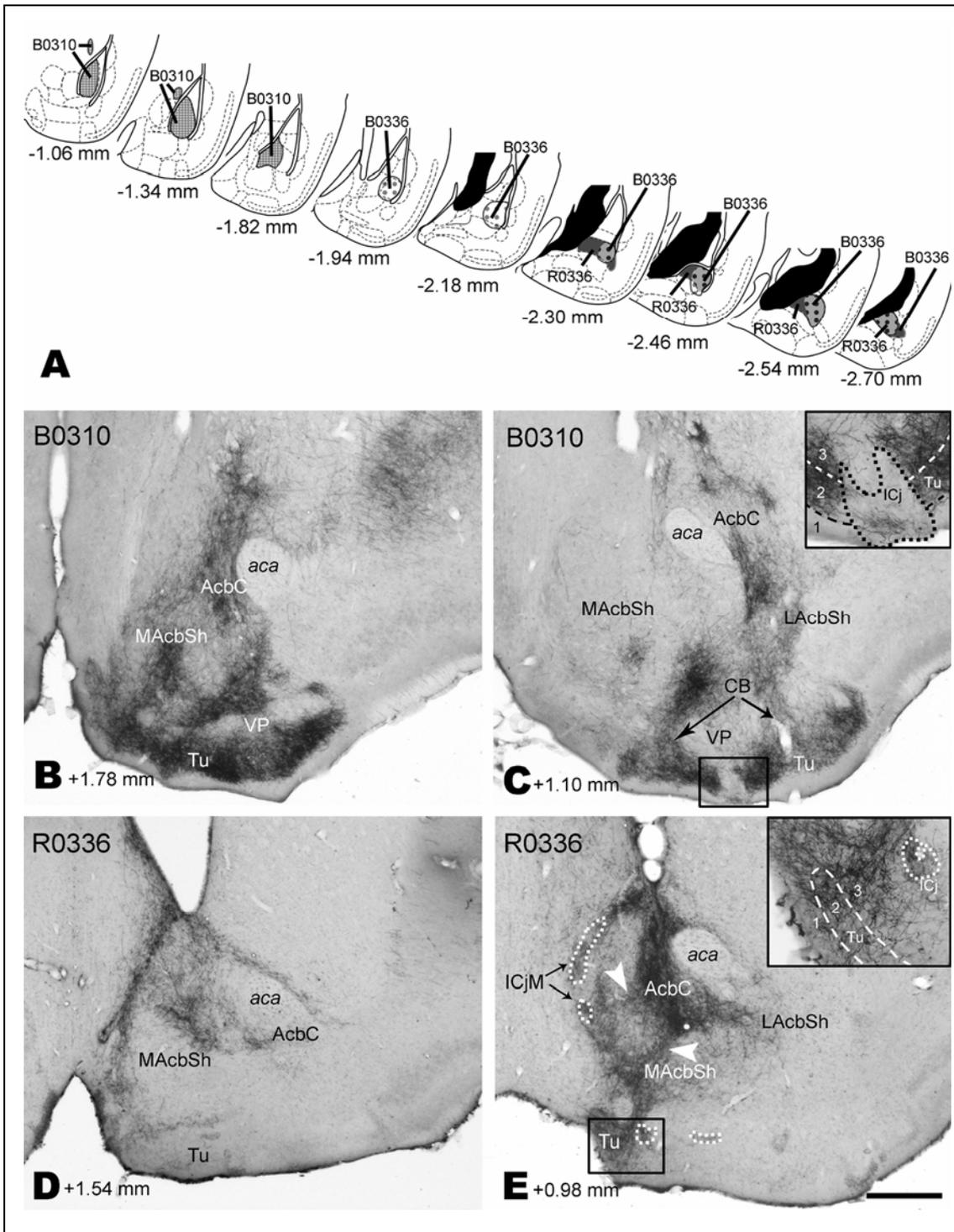
El Acb presentaba campos de fibras y terminales densamente marcadas en todas sus divisiones (Tabla 3). El AcbC mostraba marcaje anterógrado a lo largo de toda su extensión rostro-caudal (Tabla 3). El marcaje en su mitad lateral era muy denso y mostraba un patrón complejo de manchas o “parches” de marcaje (Fig. 22C), mientras que en el AcbC medial, el marcaje estaba compuesto por un denso campo terminal en su extremo más rostral además de fibras dispersas en el resto del núcleo (Fig. 22B).

El MAcbSh presentaba densas manchas de marcaje fibrilar y terminal confinadas a su porción ventral (Fig. 22B-C). Este marcaje mostraba continuidad, a través de los CB (Fig. 22C) con campos terminales, aun más densos, en el Tu medial (Fig. 22B-C). Por contra, en la porción dorsal del MAcbSh sólo eran visibles unas pocas fibras dispersas que no formaban campos terminales bien definidos (Fig. 22B-C). En cuanto al LAcbSh, presentaba un denso campo terminal a niveles caudales que, como en el caso del MAcbSh, era continuo con un marcaje extremadamente denso en los CB y Tu laterales (Fig. 22C). De este modo, el Tu mostraba marcaje anterógrado en prácticamente toda su extensión medio-lateral a niveles rostrales y su porción lateral a niveles caudales. Este marcaje del Tu era denso en la capa 3 y extremadamente denso en la capa 2 (Fig. 22B-C e

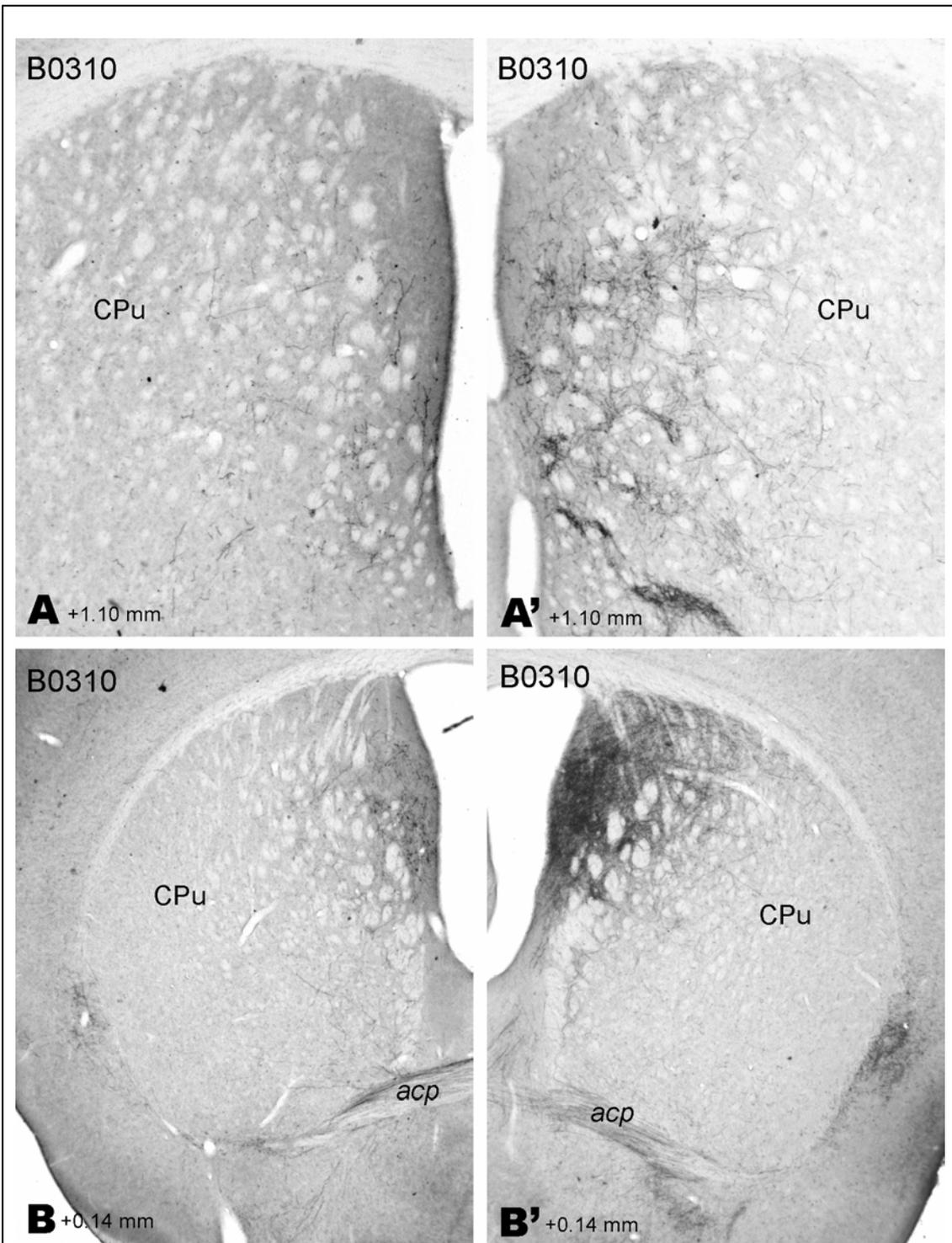
detalle en 22C), pero no mostraba una clara asociación con los ICj profundos o con el ICjM. De hecho el marcaje anterógrado en el Tu mostraba una “calva” o “hueco” en donde se encontraban ICj superficiales (Fig. 22C y detalle), aunque éstos eran alcanzados por unas pocas fibras marcadas gruesas y varicosas (ver detalle en la Figura 22C).

En el CPu, el marcaje anterógrado también era extremadamente denso y profuso en toda su extensión rostro-caudal. Como en el estriado ventral, la densidad de ese marcaje era heterogénea apareciendo densas manchas o “parches” de marcaje fibrilar y terminal especialmente denso. A niveles pre-comisurales rostrales del CPu aparecían campos terminales de fibras que ocupaban la mitad medial de la estructura, encontrándose los parches más densos en la región ventral, cercana al AcbC (Fig. 23A; Tabla 5). A medida que nos adentrábamos en los niveles pre-comisural caudal y comisural, las fibras marcadas y los campos terminales se hacían más densos y ocupaban preferentemente la región medial del CPu adyacente al ventrículo, aunque podían encontrarse fibras dispersas por toda la estructura (Fig. 23B; Tabla 5). Con la aparición del globo pálido lateral (LGP), las fibras y parches ocupaban predominantemente la mitad dorsal del CPu (sobre todo el adyacente al ventrículo), aumentando la densidad a medida que nos desplazábamos a los niveles CPu post-comisurales, alcanzándose el máximo de marca anterógrada en su porción más rostral (Fig. 23 cont.C).

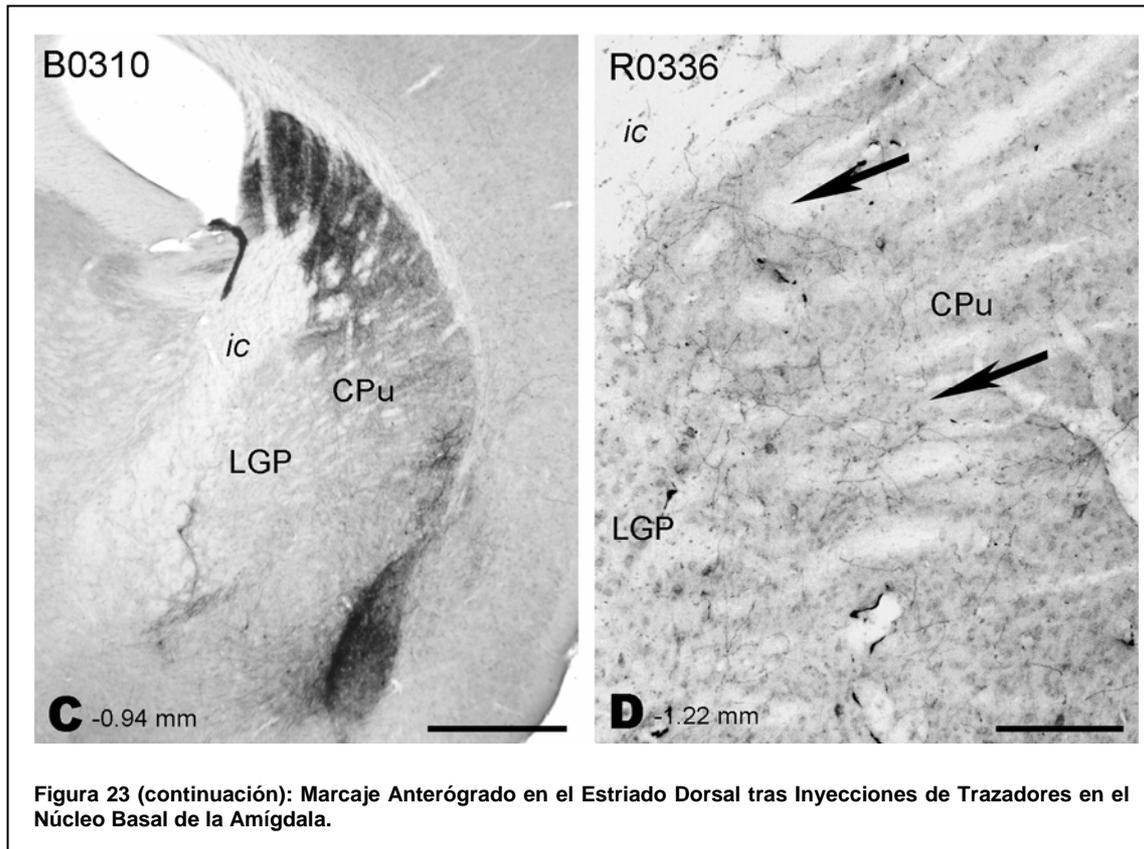
Esta inyección también mostraba fibras marcadas en la *acp* (Fig. 23B-B’), en relación con las cuales aparecía marcaje anterógrado relativamente denso en el hemisferio contralateral tanto en el Acb (especialmente el LAcbSh y el AcbC rostral, Tabla 3) como en el resto del estriado ventral (Tabla 4) y dorsal (Tabla 5; Fig. 23A’-B’). En todas las estructuras, el marcaje contralateral era claramente simétrico al del hemisferio homolateral.



**Figura 22: Marcaje Anterógrado en el Estriado Ventral tras Inyecciones de Trazadores en el Núcleo Basal de la Amígdala.** Dibujos de la extensión de las inyecciones de trazadores en el núcleo basal de la amígdala (A) y fotografías del marcaje anterógrado resultante en el estriado ventral (B-E). En cada sección se indica la coordenada antero-posterior respecto a Bregma y el código de cada inyección. Tras una inyección de trazador en el Ba (B0310; B-C), el marcaje en el AcbSh muestra continuidad con el encontrado en el Tu a través de los CB. El marcaje en el Tu ocupa las capas 2 y 3, mientras que la capa 1 está prácticamente libre de marca (detalle en C). Los ICj están casi totalmente desprovistos de marcaje, aunque unas pocas fibras marcadas gruesas entran en los grupos de células granulares (ver detalle en C). Marcaje anterógrado en el estriado ventral tras la inyección R0336, que afectaba a una gran porción del Bp (D-E). El marcaje en el área central (*core*) del Acb mostraba continuidad con el marcaje encontrado en el MAcbSh (ver cabezas de flecha blancas en E) y, a través de él, con el marcaje en los CB y en el Tu medial. El detalle en E muestra que el marcaje en el Tu ocupa no solo las capas 2 y 3 sino también la parte más profunda de la capa 1. Barra de calibración en E = 400  $\mu$ m, válida para toda la figura.



**Figura 23: Marcaje Anterógrado en el Estriado Dorsal tras Inyecciones de Trazadores en el Núcleo Basal de la Amígdala.** En cada sección se indica la coordenada antero-posterior respecto a Bregma y el código de cada inyección. Tras una inyección de trazador en el Ba (B0310; A-C), el marcaje en el CPu pre-comisural (A-A') muestra continuidad con el encontrado en el AcbC, mientras que la mayor densidad de marca a niveles comisurales (B-B') y post-comisurales (C) se encuentran en la porción medio-dorsal de la estructura. Marcaje anterógrado en el estriado dorsal tras la inyección R0336, que afectaba a una gran porción del Bp (D). Las flechas indican algunos campos terminales en el CPu que se localizaban principalmente en la zona adyacente al globo pálido lateral. Barra de calibración en C = 250 $\mu$ m (también válida para A, A', B, B'). Barra de calibración en D = 125 $\mu$ m.



#### 5.2.3.2.2 Inyecciones en el Núcleo Basal Posterior

El Bp se vio afectado por dos inyecciones (B0336 y R0336). La inyección B0336 abarcaba el Bp caudo-lateral, mientras que la R0336 era una inyección restringida al extremo caudal del Bp (Fig. 22A). Ambos casos mostraban un patrón de marcaje anterógrado similar que difería substancialmente del encontrado tras las inyecciones en el Ba. La mayor parte de las fibras marcadas que conectaban el lugar de inyección con el estriado ventral cursaban por la *st* (fundamentalmente dirigidas al AcbC y MAcbSh) y el *ansa peduncularis* (SI/IPAC, fundamentalmente conectadas con el LAcbSh). Por su parte, un pequeño contingente de fibras marcadas accedía al Tu a través del LOT. Por último, algunas fibras adoptaban una dirección dorsal para inervar el CPu.

El AcbC presentaba un marcaje anterógrado extremadamente denso (Fig. 22E) restringido a su porción caudo-medial, que parecía ser continuación rostral de un denso campo terminal del núcleo de la *stria terminalis* (BST, no ilustrado). En el MAcbSh se apreciaba un denso campo terminal en su límite medial (Fig. 22D-E), que presentaba una discontinuidad a la altura del ICjM, aunque algunas pocas fibras inervaban esta estructura (Fig. 22E). Algunas “manchas” o “parches” de denso marcaje conectaban este

campo terminal con el encontrado en el AcbC (ver las puntas de flecha blancas, Fig. 22E), mientras que el resto del MAcbSh mostraba, relativamente, menos marcaje. El marcaje en la periferia del MAcbSh presentaba continuidad, a través de los CB mediales, con el Tu medial (Fig. 22E), en donde las fibras marcadas inervaban la capa 1 profunda, así como en las capas 2 y 3 (ver detalle en la Fig. 22E). Como en el caso del ICjM, los ICj mediales eran alcanzados por unas pocas fibras marcadas (ver detalle en la Fig. 22E). En el LAcbSh, el marcaje anterógrado era muy difuso y su densidad decrecía gradualmente de caudal a rostral (Tabla 3; Fig. 22D-E).

En el CPu, la densidad de fibras marcadas anterógradamente era mucho menor que la encontrada en la inyección en el Ba. En los niveles más rostrales del CPu (nivel pre-comisural rostral) se encontraban algunas fibras, sobre todo a lo largo de la región adyacente al ventrículo (no mostrado). En el CPu pre-comisural caudal se podían observar algunas fibras con botones en la región más ventral justo por encima del AcbC y en la región cercana al ventrículo (sin ilustrar). La densidad de marca anterógrada a nivel del CPu comisural también era baja, encontrándose algunas fibras en la zona más ventral adyacente al IPAC. En los niveles del CPu post-comisural se observaron fibras marcadas dispersas por todo el CPu, aunque con cierta tendencia a encontrarse en el límite con el LGP (Fig. 23 cont.D). La densidad de las fibras marcadas decrecía en los niveles post-comisurales más caudales (ver Tabla 5).

En estas inyecciones, algunas fibras marcadas cruzaban la línea media a través de la *acp* y daban lugar a un marcaje anterógrado disperso pero conspicuo en el estriado ventral y dorsal contralateral (Tablas 3-5).

#### 5.2.3.2.3 Inyección en el Núcleo Basal Accesorio Anterior

La inyección B0311 estaba centrada en el extremo rostral del ABa y también afectaba a la porción medial del COAa y a los núcleos intercalados de la amígdala (I), así como a algunas pocas células del AAD y de la SI (Fig. 24). Al contrario que las inyecciones en el B, este caso sólo presentaba un marcaje disperso en el Acb y en el Tu (Tabla 3; Fig. 24B). Desde el lugar de inyección, se podía seguir algunas fibras marcadas gruesas a través de la *st* hasta los campos terminales en el BST y el AcbC caudal dorso-lateral (sin ilustrar). Las restantes fibras marcadas que dejaban el lugar de inyección formaban tres fascículos bien definidos. Algunas de éstas atravesaban la IPAC (*ansa*

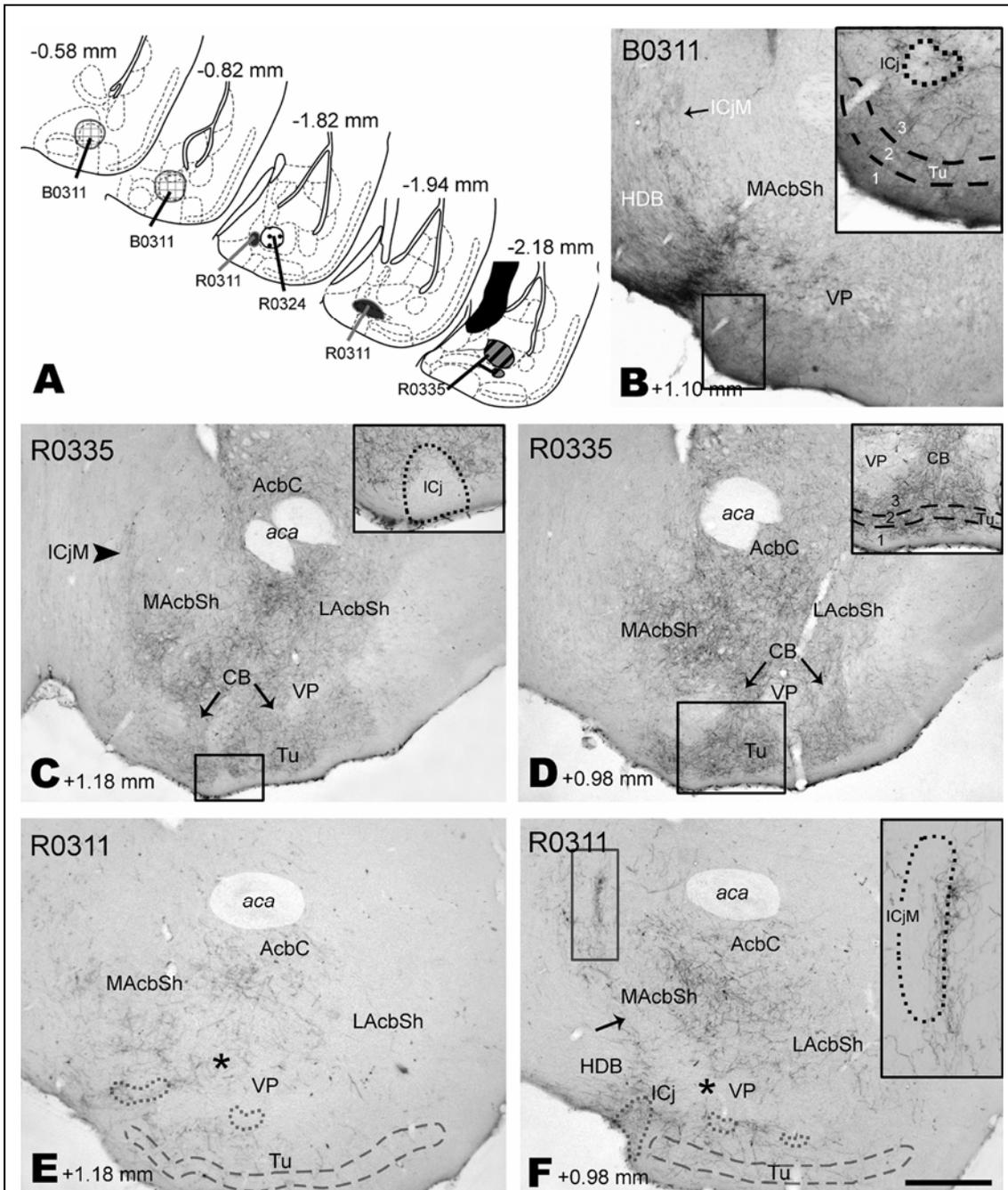
*peduncularis*) hasta campos terminales en el LAcbSh caudal (sin ilustrar). Otro fascículo bien delimitado de fibras marcadas corría en dirección rostral inmediatamente por encima del LOT para inervar extensamente la rama horizontal del núcleo de la banda diagonal (HDB), aunque algunas de sus fibras parecían entrar en el Tu medial, en donde inervaban las tres capas (ver detalle en la Fig. 24B). Aparentemente, unas pocas fibras marcadas entraban en algunos ICj (ver detalle en la Fig. 24B), incluido el ICjM (Fig. 24B). Igualmente, en esta inyección (B0311) aparecían algunas fibras marcadas en los CB más mediales (Fig. 24B). El último fascículo de fibras marcadas también corría por el *ansa peduncularis* (a través de la SI) pero daba lugar a un campo terminal relativamente denso en el pálido ventral (VP, Fig. 24B). Además, el MAcbSh ventral mostraba unas pocas fibras marcadas, aparentemente conectadas con los fascículos que inervaban el HDB y/o el VP (Fig. 24B).

En el CPu pre-comisural y comisural, se encontraban algunas fibras con botones marcadas en la región ventral adyacente al AcbC (o al IPAC a niveles más caudales; Fig. 25A). A nivel del CPu post-comisural rostral se encontraban fibras varicosas dispersas.

El estriado ventral caudal y el CPu post-comisural rostral contralaterales también mostraban unas pocas fibras marcadas (ver Tablas 3-5), probablemente conectadas con el marcaje fibrilar observado en la *acp*.

#### 5.2.3.2.4 Inyecciones en el Núcleo Basal Accesorio Posterior

Las dos pequeñas inyecciones localizadas en el ABp (R0324 y R0335; con unas pocas células marcadas en el AHAi en este último caso; Fig. 24A) compartían un patrón similar de marcaje de fibras (Tablas 3-5). Al igual que en otras inyecciones, se observaron tres grupos principales de fibras marcadas que abandonaban la inyección en dirección al estriado ventral. Por la *st* corrían fibras finas que daban lugar a un campo terminal moderadamente denso en todo el AcbC y en el MAcbSh ventral (Fig. 24C-D). Desde el lugar de inyección, otro grupo de fibras marcadas corría hacia adelante a través del *ansa peduncularis* dando lugar a un campo terminal que se extendía desde el IPAC hasta el LAcbSh caudal, donde el marcaje era menos denso (Tabla 3; Fig. 24C-D). Un tercer grupo de fibras marcadas cursaba rostralmente por el fascículo longitudinal asociativo



**Figura 24: Marcaje Anterógrado en el Estriado Ventral tras Inyecciones de Trazadores en el Núcleo Basal Accesorio y en el Área Amígdalo-Hipocámpica de la Amígdala.** Dibujos de la extensión de las inyecciones de trazadores en el núcleo basal de la amígdala (A) y fotografías del marcaje anterógrado resultante en el estriado ventral (B-F). En cada sección se indica la coordenada antero-posterior respecto a Bregma y el código de la inyección. Tras una inyección de trazador en el ABa (B0311; B) se observa marcaje anterógrado en el MACbSh y el en Tu medio-caudal más medial, así como escasas fibras marcadas en algunos ICj y en las tres capas del Tu (detalle). (C-D) Una inyección de RDA en el ABp (R0335; sin contrastar; C-D) muestra marcaje extenso en las áreas central (*core*) y periférica (*shell*) del Acb (especialmente en el LAcSh) y en las cercanías del ICjM (cabeza de flecha en C). En el Tu, el marcaje anterógrado se encuentra en las capas 2 y 3 y en la parte profunda de la capa 1 (detalle en D). Tras una inyección de RDA restringida al AHA lateral (R0311; sin contrastar; E-F), el marcaje anterógrado ocupa la parte ventral del área central (*core*) del Acb así como porciones del área periférica (*shell*) medial (ver flecha en F) y lateral. También se encuentran escasas fibras marcadas en los CB vecinos (asteriscos) y en el Tu, así como campos terminales conspicuos en los ICj mediales y, especialmente, cerca del ICjM (detalle en F). Barra de calibración en F = 400  $\mu$ m, válida para toda la figura.

(atravesando el área anterior amigdalina ventral, AAV) y alcanzaba el Tu, donde las fibras marcadas inervaban, preferentemente, las capas 2, 3 y 1b de su porción central (detalle en la Fig. 24D). El marcaje en el Tu mostraba continuidad, a través de los CB, con el observado en el AcbSh (ver flechas negras en la Fig. 24C-D). Unas pocas fibras marcadas estaban asociadas al margen interno de la mayoría de ICj (detalle en la Fig. 24C) y, en menor medida, al borde interno del ICjM (ver punta de flecha negra en Fig. 24C).

Por último, desde el lugar de inyección algunas fibras corrían dorsalmente hasta inervar el estriado dorsal en toda su extensión rostro-caudal (Tabla 5). En los niveles del CPu pre-comisurales y comisural se podían observar numerosas fibras finas marcadas en toda la extensión, sobre todo en la región ventral, donde se observaban densos plexos de fibras en la zona justo dorsal al AcbC (y al BST y al IPAC a niveles más caudales) y en zona medial yuxtaventricular, acentuándose la preferencia por la región medial a medida que avanzábamos hacia los niveles más caudales (Fig. 25B-C). Sin embargo, a niveles post-comisurales el marcaje fibrilar se hacía más denso y extenso, sobre todo en la región más dorsal del CPu y en el límite con el LGP (Fig. 25D).

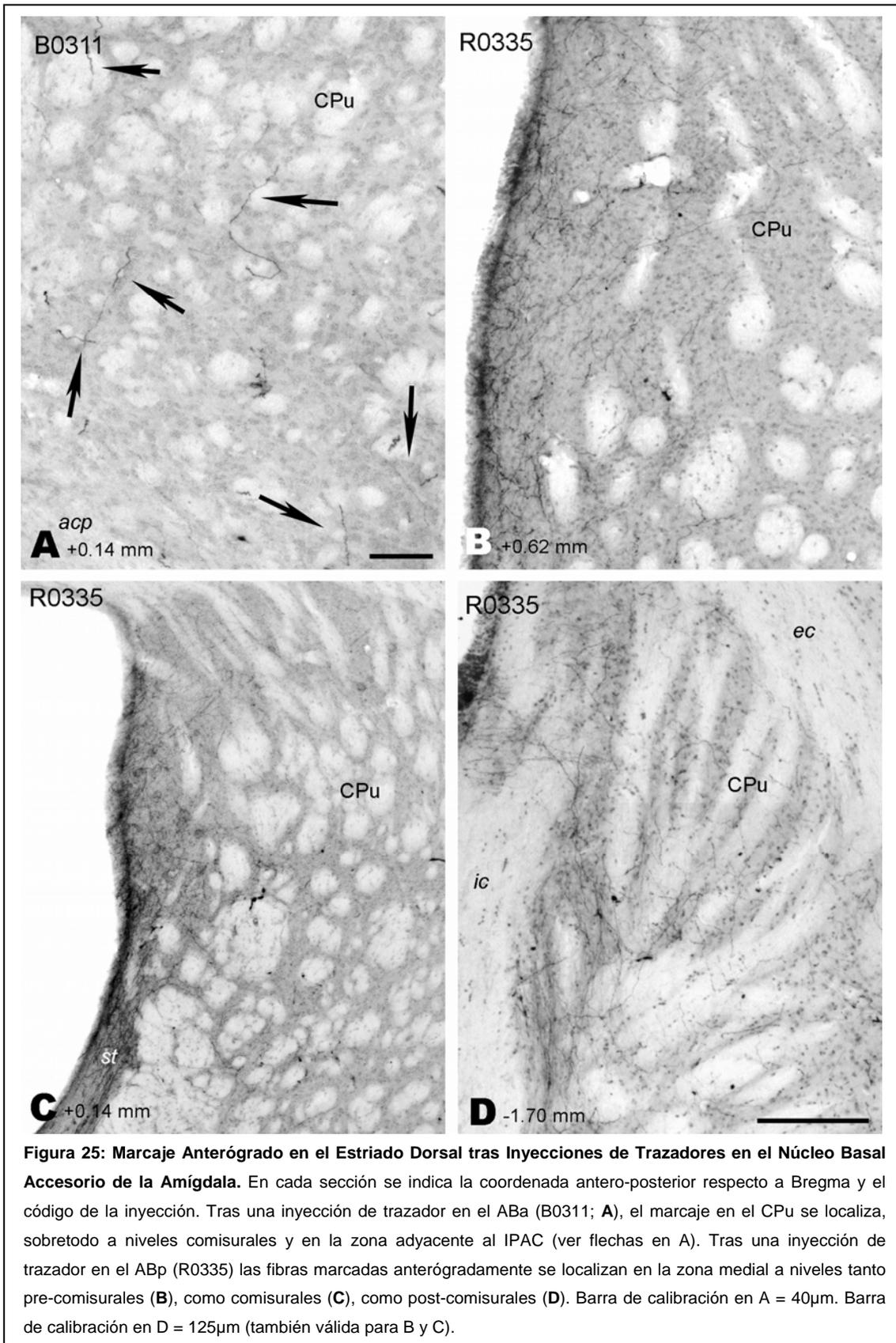
En ambas inyecciones, el estriado contralateral también mostraba una densidad moderada de marcaje y una distribución simétrica a la del hemisferio contralateral (Tablas 3-5).

#### 5.2.3.2.5 Inyección en el Área Amígdalo-Hipocámpica

Una pequeña inyección (R0311) estaba prácticamente restringida al extremo rostral del AHA1, aunque probablemente también estaban marcadas unas pocas células del MeP vecino (Fig. 24A). Las fibras marcadas que abandonaban el lugar de inyección en

dirección rostral (hacia el estriado ventral) se incorporaban a tres fascículos, la *st* (que generaba una inervación densa de partes del BST), el *ansa peduncularis* (el IPAC/SI) y el

fascículo longitudinal asociativo (el AAV). Las fibras en la *st* inervaban aparentemente el AcbC (especialmente su mitad ventral), donde el marcaje decrecía gradualmente en dirección rostral (ver Tabla 3; Fig. 24E-F), y el MAcbSh intermedio-caudal. Aquí las fibras



**Figura 25: Marcaje Anterógrado en el Estriado Dorsal tras Inyecciones de Trazadores en el Núcleo Basal Accesorio de la Amígdala.** En cada sección se indica la coordenada antero-posterior respecto a Bregma y el código de la inyección. Tras una inyección de trazador en el ABa (B0311; **A**), el marcaje en el CPu se localiza, sobretodo a niveles comisurales y en la zona adyacente al IPAC (ver flechas en **A**). Tras una inyección de trazador en el ABp (R0335) las fibras marcadas anterógradamente se localizan en la zona medial a niveles tanto pre-comisurales (**B**), como comisurales (**C**), como post-comisurales (**D**). Barra de calibración en **A** = 40µm. Barra de calibración en **D** = 125µm (también válida para **B** y **C**).

marcadas involucran preferentemente el límite centro- periferia (*core-shell*; Fig. 24E-F) y la región medial del núcleo (flecha negra en la Fig. 24F). Además, se observaba un denso plexo de fibras marcadas en contacto con la cara interna del ICjM (ver detalle en la Fig.

24F). El marcaje anterógrado en el IPAC/SI se extendía rostralmente hasta los niveles intermedio-caudales del LAcbSh, en donde formaban un campo terminal disperso (Fig. 24F). Finalmente, las fibras marcadas que cursaban por el AAV se dirigían aparentemente hacia el Tu (y el HDB), en donde se distribuían en las tres capas e inervaban preferentemente su mitad medial (Fig. 24E-F). Este campo terminal conectaba, a través de los CB, con el marcaje observado en el AcbSh (ver asterisco negro en la Fig. 24E-F). El marcaje en esta zona del estriado ventral incluía también un gran número de fibras marcadas, asociadas íntimamente con los ICj mediales (Fig. 24F). Como hemos dicho, el ICjM mostraba un marcaje similar (detalle en la Fig. 24F).

El CPu estaba desprovisto de marcaje anterógrado.

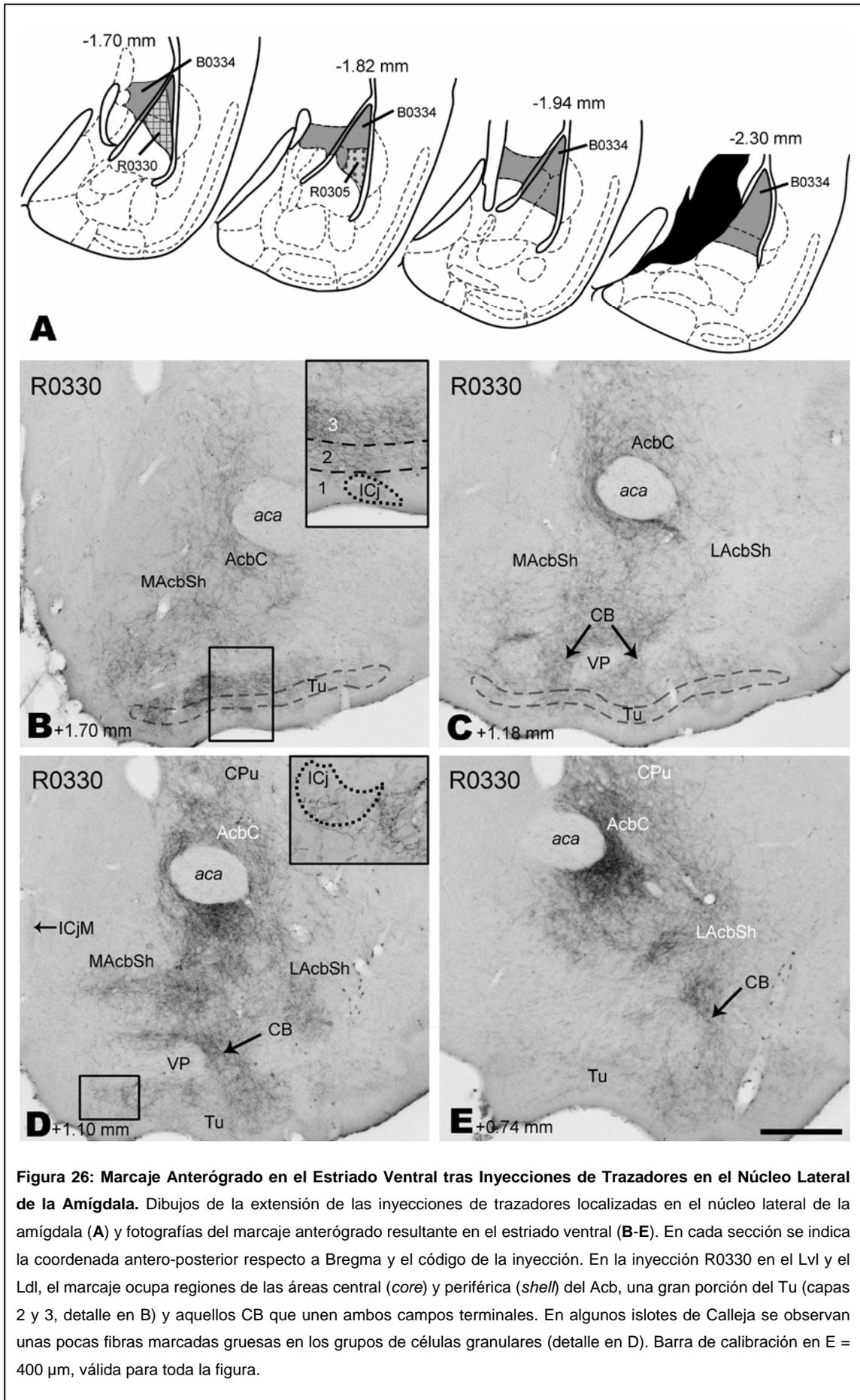
Algunas fibras marcadas cruzaban la línea media a través de la *acp* para inervar el estriado ventral caudal contralateral (Tablas 3-4).

#### 5.2.3.2.6 Inyecciones en el Núcleo Lateral

En nuestros experimentos, realizamos tres inyecciones en el L (ver Fig. 26). La inyección R0305 se encontraba restringida al Lvl rostral. La inyección R0330 estaba centrada en el Lvl a niveles intermedio-caudales, aunque también afectaba a la parte ventral del Ldl y, ligeramente, al CPu caudo-ventral. Finalmente, una inyección de BDA afectaba a todo el L caudal (Ldl, Lvl y Lm) y a parte del AStr y del CPu (B0334).

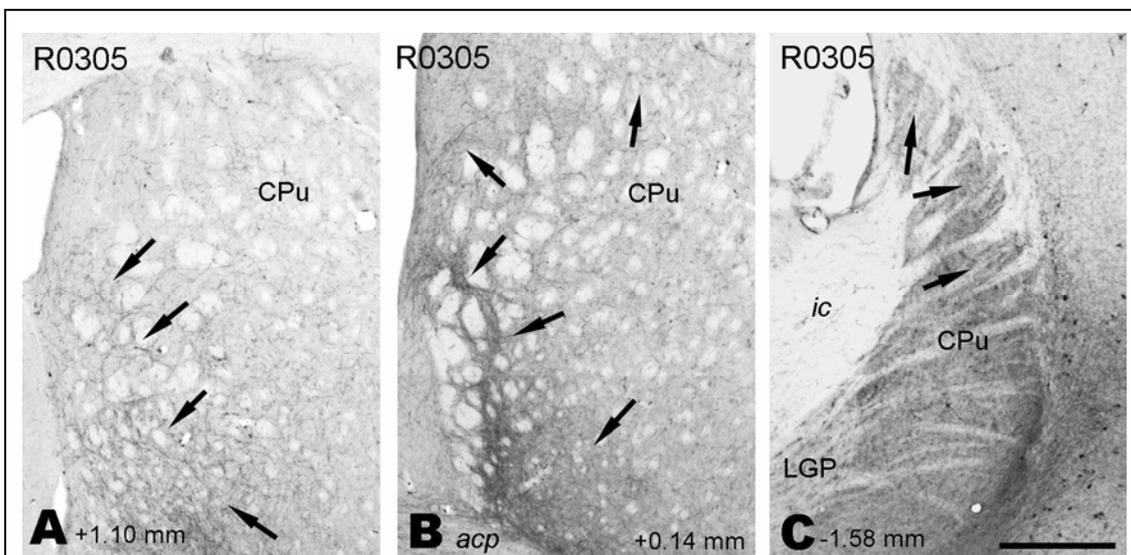
En estas tres inyecciones, las fibras marcadas abandonaban el lugar de inyección en dirección rostral a través de la *st* para alcanzar la parte más ventral del CPu y también al AcbC. De hecho, el AcbC mostraba el campo terminal más denso de todo el estriado ventral (Tabla 3; Fig. 26B-E), especialmente su porción ventro-lateral. Desde el AcbC, algunas fibras anterógradamente marcadas se extendían al MAcbSh ventral adyacente y formaban un campo terminal conspicuo (Fig. 26B-D). En contraposición, la porción dorsal del MAcbSh, interpuesta entre el área central del Acb y el septum medial, estaba prácticamente desprovista de marca (Fig. 26B-D). Por otra parte, algunas fibras marcadas cursaban por el *ansa peduncularis* (a través de la SI y del IPAC) conectando el lugar de inyección con un campo terminal moderado-denso en el LAcbSh intermedio-caudal (Fig. 26E). En las tres inyecciones, el Tu mostraba marcaje anterógrado, si bien éste era mucho más escaso tras una inyección relativamente grande en el L caudal (B0334) que tras las

pequeñas inyecciones en el L rostral (R0305, R0330). En estas últimas inyecciones, el Tu mostraba un marcaje extenso



pero heterogéneo (más denso a niveles rostrales que a caudales) que ocupaba, preferentemente, la capa 3 y en menor medida la capa 2 (Fig. 26B-D; detalle en la Fig. 26B). Como en las restantes inyecciones en la amígdala palial, el marcaje en el Tu presentaba continuidad a través de los CB con el marcaje en el AcbSh (Fig. 26C-E). Además, las fibras anterógradamente marcadas alcanzaban los ICj más mediales (ver detalle en la Fig. 26D), pero no el ICjM (ver Fig. 26D).

Las inyecciones en el L (R0305, R0330, B0334) mostraban un marcaje anterógrado en el CPu profuso. En las tres inyecciones en el polo rostral de los hemisferios cerebrales (niveles pre-comisurales y comisurales) se encontraba marcaje anterógrado disperso por todo el CPu, pero se observaban densos campos de fibras en la región ventral (que parecían ser una continuación dorsal del marcaje encontrado en el AcbC y en el BST y en IPAC más caudalmente) y en la región medial (zona adyacente al ventrículo) (Fig. 27A, ver flechas). Sin embargo, a medida que progresábamos caudalmente (niveles comisurales y post-comisurales), se encontraron diferencias en la localización del marcaje anterógrado en función del lugar de inyección. Así, en la inyección localizada en el Lvl, aunque se seguían observando fibras en la zona más medial yuxtaventricular (ver flechas en la Fig. 27B), más caudalmente las fibras marcadas



**Figura 27: Marcaje Anterógrado en el Estriado Dorsal tras Inyecciones de Trazadores en el Núcleo Lateral de la Amígdala.** En cada sección se indica la coordenada antero-posterior respecto a Bregma y el código de la inyección. Tras una inyección de trazador en el Lvl (R0305), el marcaje en el CPu a niveles pre-comisurales (A) se localiza en las porciones yuxtaventricular y adyacente al AcbC. A niveles comisurales (B) la marca anterógrada se observa, sobre todo en la zona yuxtaventricular y adosada al IPAC. A niveles post-comisurales (C) las fibras marcadas anterógradamente se localizan especialmente en la zona dorsal. Las flechas en las figuras indican algunos campos terminales en el CPu. Barra de calibración en C= 300µm válida para toda la figura.

adoptaban preferentemente una posición más dorsal (Fig. 27C, ver flechas). En el caso de las inyecciones que afectaban al Ldl caudal (R0330 y B0334), el marcaje anterógrado a nivel del CPu más posterior era relativamente más denso y con una cierta tendencia a encontrarse en la región ventral. En estos casos la valoración de este marcaje era más compleja debido a que en ambas inyecciones parte del CPu a ese nivel estaba afectado.

En todas las inyecciones que afectaban al L, el marcaje anterógrado en el estriado era claramente bilateral con dominancia ipsilateral y simétrico (ver Tablas 3-5).

## **5.3 DISCUSIÓN**

Nuestro trabajo combina el trazado anterógrado y retrógrado para analizar las proyecciones de la amígdala palial al estriado. En primer lugar, vamos a interpretar conjuntamente los resultados de ambos tipos de experimentos para inferir las principales proyecciones que unen ambas estructuras en el ratón y discutiremos los resultados de otros autores en diferentes especies de mamíferos. En segundo lugar, discutiremos nuestros resultados desde el punto de vista funcional, en el contexto de la transferencia de estímulos quimiosensoriales desde centros secundarios de la amígdala al sistema de refuerzo del cerebro para mediar respuestas apetitivas (Martínez-García et al., 2007b).

### **5.3.1 Proyecciones Amígdalo-Estriatales en Mamíferos**

Nuestros resultados demuestran la existencia de proyecciones masivas al estriado ventral, procedentes tanto de los núcleos superficiales como de los núcleos profundos de la amígdala palial. Por el contrario las proyecciones amigdalinas al estriado dorsal se originan casi exclusivamente en núcleos profundos de la amígdala palial. No obstante, algunas de estas proyecciones son densas y extensas, lo que sugiere que tienen una gran importancia en la función estriatal.

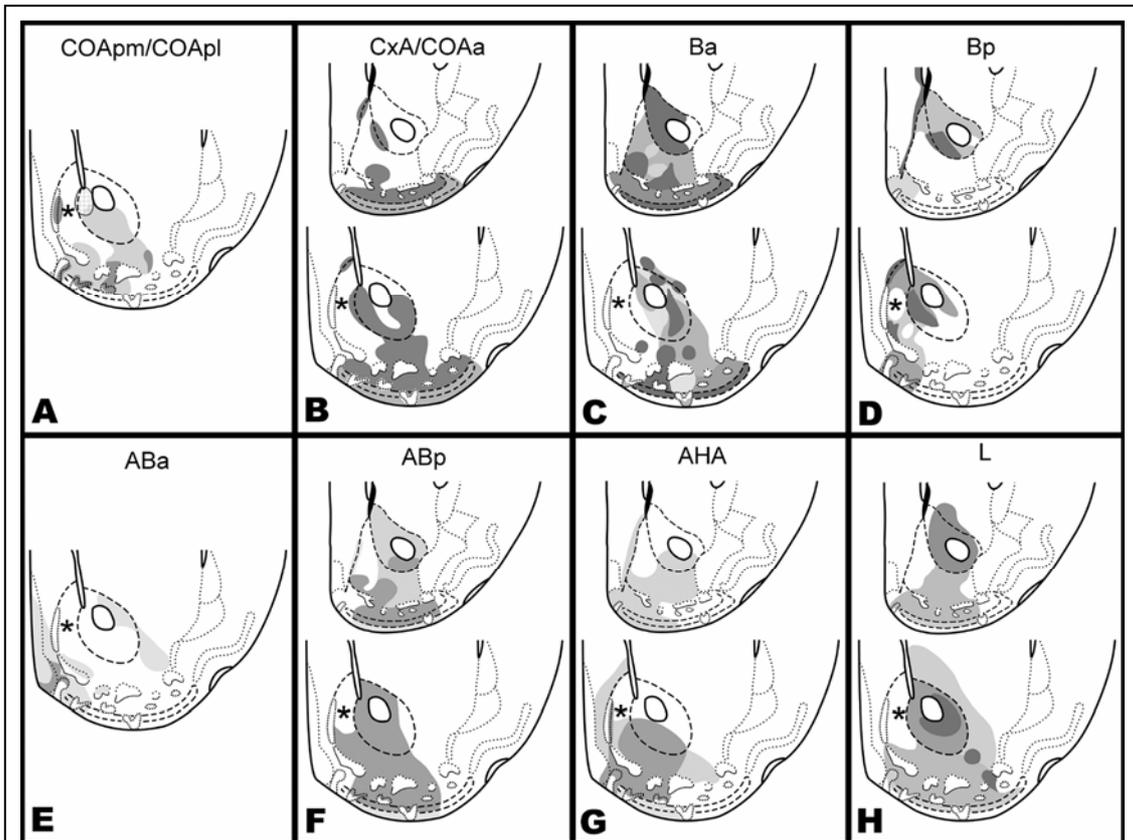
#### ***5.3.1.1 Vías Amigdalinas al Estriado Ventral***

Todas las inyecciones en la amígdala dieron lugar a marcaje anterógrado de fibras en todos los compartimentos del estriado ventral, es decir, en el área central y periférica del núcleo accumbens, el tubérculo olfativo y los puentes celulares interpuestos entre ambas estructuras. Además, cada una de las inyecciones en el núcleo accumbens dio lugar a neuronas marcadas retrógradamente tanto en los núcleos superficiales (corticales) como en los núcleos profundos de la amígdala palial.

En concordancia con descripciones previas de algunas proyecciones amígdalo-estriatales (Johnston, 1923; Kelley et al., 1982; Petrovich et al., 1996) nuestro estudio revela que los núcleos paliales de la amígdala usan tres vías para inervar el estriado ventral, la *stria terminalis*, el *ansa peduncularis* y el fascículo longitudinal asociativo. En general, las fibras amigdalinas que acaban en el AcbC y el AcbSh dorso-medial parecen discurrir por la *stria terminalis* y representar una extensión rostral de los campos terminales de estas mismas estructuras amigdalinas en el BST. Una segunda vía amígdalo-estriatal cursa por el *ansa peduncularis* (SI/IPAC) y sus fibras inervan el AcbSh lateral, alcanzando quizás el AcbC caudo-lateral. Un tercer contingente de fibras amígdalo-estriatales ingresa en el llamado fascículo longitudinal asociativo (Johnston, 1923) y desde éste entra directamente en el extremo caudal del estriado ventral. Esta vía parecer ser la usada por la mayoría de la proyecciones amigdalinas al Tu y a los puentes celulares del estriado ventral (CB). Las fibras que corren por las tres vías deben contribuir conjuntamente a la inervación de la porción ventral del AcbSh y de los CB adyacentes.

#### 5.3.1.1.1 Proyecciones Amigdalinas al Núcleo Accumbens

Las proyecciones amigdalinas al Acb son muy complejas (ver Fig. 28). Prácticamente todas las regiones del área central y periférica del Acb reciben proyecciones desde uno o varios núcleos amigdalinos, con la excepción de la región del MAcbSh adyacente al ICjM, que no muestra marcaje anterógrado tras ninguna de las inyecciones realizadas en la amígdala (ver asterisco en Fig. 28). En la rata (Groenewegen et al., 1987), al igual que en el ratón (resultados propios sin publicar), esta área es el blanco de importantes proyecciones desde el *subiculum*. Por otra parte, la mayoría de las inyecciones en la amígdala dan lugar a patrones complejos de marcaje anterógrado consistentes en campos terminales discretos (manchas o parches) en el AcbSh y el AcbC con distribuciones específicas según el lugar de la inyección. Cuando se analizan estos patrones, aparecen, con



**Figura 28: Resumen de las Proyecciones desde la Amígdala Palial al Estriado Ventral en el Ratón.** Esquemas del estriado ventral del ratón (rostral en la parte superior, caudal en la inferior), que muestran los principales campos terminales de las proyecciones desde la amígdala cortical (A y B) y la amígdala profunda (C-H) en el estriado ventral. La densidad relativa de los campos terminales está representada con diferentes niveles de gris (cuanto más oscuro, más denso). El área a cuadros en el AcbC medial en A indica un campo terminal que se marca tras la inyección de COApm pero no tras la inyección centrada en el COApl. En cada figura, un asterisco señala una región del MAcbSh que aparentemente no recibe proyecciones desde la amígdala palial.

facilidad, similitudes con los resultados de estudios previos en otras especies de mamíferos. En primer lugar, tal y como se describe en ratas y gatos (Krettek y Price, 1978; Groenewegen et al., 1980; Kelley et al., 1982; Russchen y Price, 1984; McDonald, 1991a; 1991b; Brog et al., 1993; Wright et al., 1996) y en monos (Russchen et al., 1985; Price et al., 1987; Friedman et al., 2002; Fudge et al., 2002; 2004), el grueso de las proyecciones amígdalo-Acb se origina en los núcleos profundos de la amígdala (B y AB). Nuestros resultados también indican que en el ratón, al igual que en ratas y gatos (Krettek y Price, 1978; Russchen y Price, 1984; Wright et al., 1996) las proyecciones desde las partes anterior y posterior del B al Acb muestran una cierta topografía según la cual el Bp proyecta principalmente al Acb/Tu posterior medial, mientras que el Ba proyecta fundamentalmente al Acb/Tu anterior y posterolateral (Fig. 28C-D). Finalmente, el transporte anterógrado tras las inyecciones en el B y el AB revela áreas libres de marca en

el AcbSh medial (ver Fig. 28C-F) que recuerdan a aquellas descritas en la rata y el gato por Krettek y Price (1978). En ratas se ha comprobado una relación entre las manchas o parches de marcaje anterógrado derivados de determinadas inyecciones amigdalinas y las heterogeneidades reveladas por la inmunoreactividad para la calbindina (Wright et al., 1996). Ignoramos si esto también ocurre en el ratón, en todo caso, las similitudes en las proyecciones amígdalo-Acb entre ratones y otros mamíferos son bien patentes.

#### 5.3.1.1.2 Proyecciones al Núcleo Accumbens desde la Amígdala Cortical

Además de estos resultados que confirman la presencia en ratones de proyecciones amigdalinas sobre el accumbens similares a las descritas en otros mamíferos, nuestros experimentos demuestran la existencia de proyecciones amígdalo-estriatales adicionales que se originan en diversos núcleos corticales amigdalinos. A este respecto, una de las conclusiones de nuestro trabajo es que las vías amígdalo-estriatales que se originan en los núcleos corticales amigdalinos han sido subestimadas. De hecho, el transporte retrógrado tras inyecciones en el Acb revela la existencia de proyecciones al estriado ventral que se originan en el COAa y/o la CxA y el LOT en la amígdala rostral, así como en el APir y las capas profundas del COApm en la amígdala caudal (ver Tabla 1), descubrimientos coincidentes con resultados previos en ratas (Krettek y Price, 1978; McDonald, 1991b; ver figuras en Brog et al., 1993) y con datos recientes en monos (Friedman et al., 2002; Fudge et al., 2002). Estas proyecciones se ven confirmadas por los resultados de trazado anterógrado tras inyecciones en la amígdala cortical (ver Tabla 3). Conjuntamente, los resultados de transporte anterógrado y retrógrado muestran que la porción anterior de la amígdala cortical anterior (CxA/COAa) proyecta sustancialmente al Acb y al Tu/CB. Los resultados del trazado retrógrado muestran que esta proyección se origina en células profundas del límite CxA/COAa (Fig. 18B), de forma similar a como se ha descrito en ratas (McDonald, 1991b) y en monos (Friedman et al., 2002). Con respecto a la amígdala cortical caudal, nuestros resultados muestran que las proyecciones desde las células profundas del COApm al Acb son relativamente escasas, ya que acaban en porciones restringidas del AcbC y AcbLSH caudales (ver Fig. 28), hecho que concuerda con resultados previos en ratas (Canteras et al., 1992). Por el contrario, nuestras inyecciones demuestran una proyección conspicua desde el COApm (y en menor medida del COApl) al Tu profundo, a los CB y a los ICj (ver abajo).

Nuestras inyecciones en el área central y el área periférica lateral del Acb, también muestran células retrógradamente marcadas en el LOT. La localización de estas células marcadas depende del lugar de inyección: mientras que las inyecciones de trazador en el LAcbSh daban lugar a marcaje retrógrado en las capas 2 y 3 del LOT, aquellas en el AcbC sólo mostraban células marcadas en la capa 3. Estos datos coinciden con los resultados del trazado anterógrado de las proyecciones del LOT en la rata de Santiago y Shammah-Lagnado (2004).

Por último, los resultados de nuestro trazado retrógrado coinciden con los de Brog et al. (1993) en la rata, al demostrar la presencia de importantes proyecciones al MAcbSh que se originan en las áreas caudales de la transición entre la amígdala y el córtex piriforme, es decir, el APir. Aunque no hemos realizado inyecciones de trazadores en el APir, los experimentos de transporte anterógrado llevados a cabo en la rata por Shammah-Lagnado y Santiago (1999) confirman que esta proyección también se extiende a la porción caudo-medial del Tu.

#### 5.3.1.1.3 Proyecciones al Accumbens desde la L y AHA

Una conclusión adicional que se desprende de nuestros resultados es que, además de las ya conocidas proyecciones desde el B y el AB (discutidas arriba), el AHA y el L también contribuyen sustancialmente a las proyecciones desde la amígdala palial profunda al Acb. A este respecto, las inyecciones en el MAcbSh (pero también algunas inyecciones en el AcbC) dan lugar a marcaje retrógrado en la división medial del AHA y, en menor medida, en su división lateral. Esta proyección se ve confirmada por el conspicuo marcaje anterógrado encontrado en la porción caudal del AcbC y en el MAcbSh tras inyecciones en el AHA, aunque la porción del MAcbSh justo medial al ICjM aparece libre de marca (ver asterisco en la Fig. 28G), al igual que ocurre con las inyecciones en otros núcleos amigdalinos (ver arriba). Los experimentos en ratas también han demostrado sustancial transporte anterógrado al Acb caudal tras inyecciones en el AHA (Canteras et al., 1992, amígdala posterior si utilizamos su nomenclatura) y un denso transporte retrógrado en el AHA tras inyecciones en el MAcbSh (McDonald, 1991b; Brog et al., 1993).

Nuestras inyecciones en el AHA (centradas en su división lateral) dan lugar a gran cantidad de marcaje anterógrado, no sólo en el Acb (tal y como se discute arriba) sino

también en el Tu/CB (ver más abajo). Por lo tanto, esta proyección amígdalo-estriatal parece más extensa de lo que pensaba.

Finalmente, nuestros resultados claramente indican que el L, núcleo que normalmente es visto como la interfaz sensorial de la amígdala (al menos en el contexto del miedo condicionado; LeDoux et al., 1990; Pitkänen et al., 1997), muestra proyecciones importantes al estriado ventral. La existencia de esta conexión ha sido sugerida previamente en ratas mediante experimentos de trazado retrógrado (Kelley et al., 1982; McDonald, 1991a; McDonald, 1991b; Brog et al., 1993). Nuestros resultados indican que estas proyecciones se originan fundamentalmente en los subnúcleos dorsolateral (Ldl) y ventrolateral (Lvl, ver Tabla 1). Esto se ve claramente confirmado por el transporte anterógrado tras las inyecciones en el L (que abarcan al Lvl y/o al Ldl), que muestran fibras marcadas en el AcbC medio-caudal (desde donde se extienden al CPu rostro-medial), así como en la porción ventral del MAcbSh y en el LAcbSh (Fig. 28H). Esta proyección parece extenderse al complejo Tu/CB y a los ICj. Ya que el resto de proyecciones amígdalo-estriatales parecen estar conservadas en mamíferos, asumimos que las importantes proyecciones desde L al estriado reveladas por nuestros resultados no son un rasgo específico de ratones sino que estarían presentes en todos los mamíferos. De hecho, observaciones recientes sugieren que las proyecciones desde el L al Acb también existen en primates (Fudge et al., 2002; Friedman, 2002). Mientras que hay varias descripciones pormenorizadas sobre las proyecciones intra-amigdalinas del L en diversos mamíferos (Pitkänen et al., 1995; Pitkänen y Amaral, 1998), se hace necesario un análisis detallado de las proyecciones extra-amigdalinas del L para confirmar esta posibilidad.

#### 5.3.1.1.4 Proyecciones Amigdalinas al Tubérculo Olfativo, Puentes Celulares Estriatales e Islotes de Calleja

Nuestros experimentos de trazado de conexiones revelan importantes proyecciones desde el complejo amigdalino al Tu y los CB (ver Fig. 28). En este sentido, si bien hay descritas importantes aferencias desde el complejo amigdalino a partes del Tu en ratas y gatos (Krettek y Price, 1978; Kelley et al., 1982; Russchen y Price, 1984; Wright et al., 1996) y en monos (Price et al., 1987; Friedman et al., 2002; Fudge et al., 2002), las proyecciones amigdalinas a los CB han recibido mucha menos atención. No obstante, en nuestros experimentos el marcaje en una porción del Tu siempre viene acompañado del

marcaje de los CB adyacentes a la misma (ver Tabla 4). Esto sugiere que el Tu y los CB están funcionalmente relacionados, ya que comparten sus *inputs* amigdalinos. De hecho, se puede considerar que el Tu y los CB forman conjuntamente una estructura laminar, cuyas aferencias muestran también una organización laminar. Así, todas nuestras inyecciones en la amígdala dan marcaje anterógrado en las capas 2 y 3 del Tu y en los CB (Figs. 21, 22, 24, 26 y 28). Cuando analizamos en detalle estos resultados, observamos que las proyecciones originadas en el Ba (y en el L, ver más abajo) delimitan claramente las capas 2 (densamente marcada) y 1 (que apenas presenta marca; Fig. 22B-C; Fig. 23). Por su parte, el COApm/COApl inervan principalmente la capa 3 de una porción del Tu y los CB adyacentes a la misma (ver detalle en la Fig. 21D) algo que concuerda parcialmente con los resultados obtenidos por Kevetter y Winans (1981). Por el contrario, las proyecciones de otros núcleos amigdalinos alcanzan también la capa 1b, como sucede con las originadas en el Bp y el AB (así como en el AHA y el CxA, ver abajo; Figs. 21G, 22E, 24D y 28).

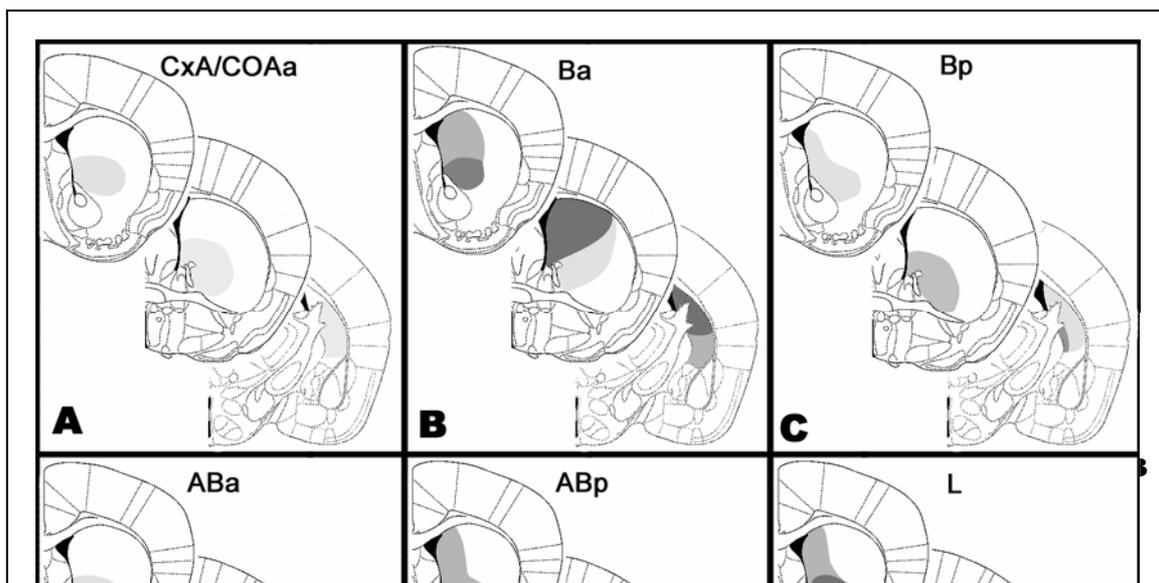
El transporte anterógrado desde la amígdala revela, además, que los distintos núcleos amigdalinos presentan proyecciones diferenciales a porciones específicas (en los ejes medio-lateral y rostro-caudal) del Tu. Por ejemplo, el COApm/COApl, el Bp, el ABA y el AHA, proyectan específicamente a la porción medial del Tu (ver Fig. 28), mientras que el ABp proyecta a la parte central del Tu. Además, las proyecciones desde el COApm/COApl y el ABA sólo alcanzan la parte caudo-medial del Tu, mientras que el Bp y el AHA proyectan a toda la extensión antero-posterior del Tu medial. Por el contrario, el CxA, el Ba y el L inervan prácticamente toda la extensión medio-lateral y rostro-caudal del Tu. Estos descubrimientos son consistentes con los resultados del marcaje retrógrado encontrado después de las inyecciones en el Tu en hámster (Newman y Winans, 1980).

Otras estructuras del estriado ventral que constituyen blancos para las aferencias amigdalinas son los islotes de Calleja, grupos de pequeñas células densamente empaquetadas que ocupan diversas posiciones dentro del estriado ventral. Muchos de ellos están dentro del Tu, donde pueden localizarse en la capa 3, en la capa 2 o incluso adentrarse en la capa 1 alcanzando por tanto la superficie pial. Entre ellos destaca por su mayor tamaño el llamado islote de Calleja magno o mayor (ICjM), que separa el AcbSh medial de la porción ventral del septum. El COApm/COApl y el AHA muestran importantes proyecciones a los ICj, incluido el ICjM (ver Tablas 2 y 4). De hecho, los

núcleos que presentaban una mayor densidad de marca retrógrada tras la inyección que afectaba al ICjM (B0312) eran el COApm y el AHA (Tabla 1). Aunque es cierto que la inyección también incluye parte del septum, es razonable utilizarla para corroborar los datos obtenidos con el trazado anterógrado ya que las únicas áreas amigdalinas que proyectan al septum son el Bp y el propio AHA. En relación a estos dos núcleos los resultados del transporte retrógrado podrían ser debidos tanto al transporte del neurotrazador desde las áreas septales como desde el ICjM. Por tanto esta inyección corrobora la proyección del COApm al ICjM mientras que las proyecciones desde el Bp y el AHA las hemos descrito únicamente en base a los resultados del trazado anterógrado. Por contra, los restantes núcleos amigdalinos dan lugar a proyecciones débiles a los ICj, que son escasas en el caso del ICjM (ver Tabla 4). Estos resultados encajan parcialmente con estudios previos sobre las conexiones de los ICj que indican que el grueso de las proyecciones amigdalinas a los ICj se origina en los núcleos corticales (Fallon, 1983). En relación con la arquitectura de los ICj, nuestros resultados indican que las proyecciones desde el COApm/COApl a los ICj acaban preferentemente en el neuropilo central de los ICj (e.g. Fig. 21B), mientras que el resto de los núcleos de la amígdala palial proyectan a la capa granular. Usando el transporte anterógrado de aminoácidos tritiados Krettek y Price (1978) describieron proyecciones al Tu/CB y a los islotes de Calleja desde la amígdala cortical posterior en ratas y gatos.

### ***5.3.1.2 Proyecciones Amigdalinas al Caudado-Putamen***

Todas las inyecciones en los núcleos profundos de la amígdala (con excepción de la localizada en el AHA) y la del CxA, dieron lugar a marcaje anterógrado de fibras en el estriado dorsal (ver Tabla 5 y Fig. 29). Además, cada una de las inyecciones en el CPu dio lugar a neuronas marcadas retrógradamente tanto en los núcleos profundos de la amígdala palial como en la amígdala cortical.



5.3.1.2.1 Proyecciones al Caudado-Putamen desde los Núcleos Profundos de la Amígdala

Tal y como se ha descrito en trabajos previos, el B es la principal fuente de proyecciones amigdalinas no solo al estriado ventral, sino también al estriado dorsal (Krettek y Price, 1978; Kelley et al., 1982; Russchen y Price, 1984; McDonald, 1991b, Fig. 29). Tal y como ocurre con las proyecciones al núcleo accumbens, las proyecciones amigdalinas al CPu están organizadas topográficamente. Según nuestros resultados el Ba proyecta fundamentalmente a la región rostro-medial y caudo-dorsal del CPu, mientras que las inyecciones en el Bp dan lugar a una densidad de marca mucho menor en el CPu caudo-medial (Fig.29). A este respecto existen ciertas discrepancias en la literatura, ya que la mayoría de los trabajos antiguos apuntan a que la porción anterior del B proyecta al CPu caudo-lateral mientras que la porción posterior lo hace al CPu rostro-medial (Krettek y Price, 1978; Kelley et al., 1982; Russchen y Price, 1984). Sin embargo, nuestros datos parecen encajar con los obtenidos por Groenewegen en 1991 mediante transporte retrógrado en la rata, según los cuales las inyecciones localizadas en el CPu rostro-medial y las que afectaban al CPu caudo-dorsal daban una densidad de marca retrógrada mucho mayor en el Ba que en el Bp. Así mismo, las inyecciones que afectaban al CPu dorso-caudal daban un marcaje retrógrado considerablemente mayor en el Bp. Además nuestros resultados confirman que las proyecciones desde el núcleo basal de la amígdala al CPu

son bilaterales y simétricas tal y como ya apuntaron Kelley et al. (1982). Finalmente, el transporte anterógrado tras las inyecciones en el B deja áreas libres de marca en el cuadrante antero-dorsal del CPu (ver Fig. 29), que recuerdan a lo descrito previamente en la rata (Kelley et al., 1982; Russchen y Price, 1984). Estas zonas libres de proyección amigdalina en la rata se corresponden con la región del CPu que recibe aferencias desde el córtex sensorimotor (Kelley et al., 1982; Russchen y Price, 1984), de ahí que algunos autores consideren que esta es una zona no-límbica del estriado (Kelley et al., 1982). Ignoramos si esto también ocurre en el ratón, en todo caso, las similitudes en las proyecciones del B al CPu entre ratones y otros mamíferos son bien patententes.

Además de las densas proyecciones al CPu con origen en el B, nuestro estudio ha revelado la existencia de proyecciones sustanciales desde el AB, en concreto desde su porción caudal (Fig. 29). A este respecto, ya existían evidencias en rata de dicha proyección (Kelley et al., 1982; McDonald, 1991b; Petrovich et al., 1996). Según nuestros datos del trazado anterógrado el ABp proyecta a la zona más ventral (en contacto con el ACbC) y medial (yuxtaventricular) del CPu rostral y a la porción que limita con el LGP del CPu post-comisural y al CPu caudo-dorsal. Estos descubrimientos son consistentes con los resultados del marcaje anterógrado encontrado después de las inyecciones en el ABp en rata (Petrovich et al., 1996) y con los resultados de trazado retrógrado tras inyecciones en el CPu (McDonald, 1991b). Algunos de los trabajos previos en ratas ignoran el marcaje anterógrado en el hemisferio contralateral (Petrovich et al., 1996), pero nuestro estudio revela un nuevo dato, y es que, al igual que ocurría con las proyecciones desde el B (Kelley et al., 1982), las proyecciones desde el ABp al CPu son claramente bilaterales y simétricas.

Además nuestros experimentos de trazado de conexiones revelan proyecciones sustanciales al estriado dorsal desde el L (Fig. 29). En este sentido, esta proyección ya había sido descrita en rata con anterioridad, aunque de manera imprecisa debido a las técnicas utilizadas y al reducido número de inyecciones en el L (Kelley et al., 1982; Russchen y Price, 1984). En dichos trabajos, se señala que el L presenta proyecciones débiles a la porción caudo-ventral del CPu, pero no se hace referencia al lugar exacto del origen de dicha proyección. Según nuestros resultados del transporte retrógrado, estas proyecciones se originan fundamentalmente en la porción anterior del subnúcleo dorsolateral (ver Tabla 2). Esto se ve confirmado por el transporte anterógrado, dado que

son las inyecciones en el L que abarcan al Ldl, las que muestran fibras marcadas en la porción ventro-medial del CPu rostral, así como en la porción caudo-ventral (ver resultados de este capítulo). Además, los resultados del transporte anterógrado revelaron que el subnúcleo Lvl también proyecta al CPu en toda su extensión, pero lo hace predominantemente a la porción dorsal del estriado post-comisural (resultados de la inyección R0305, ver Tabla 5), de ahí que las inyecciones en el CPu localizadas en porciones ventro-laterales no dieran marca retrógrada en dicho subnúcleo. Esto se ve avalado por los resultados del trazado retrógrado del trabajo de McDonald (1991b). Además de las evidencias en rata existen algunas observaciones que sugieren que las proyecciones desde el L al CPu también existen en primates (Ruscchen et al., 1985; Fudge et al., 2002), aunque se necesitan estudios más pormenorizados para confirmar esta posibilidad.

#### 5.3.1.2.2 Proyecciones al Caudado-Putamen desde partes de la Amígdala Cortical

Aunque no hay ningún trabajo previo que demuestre la existencia de una proyección procedente desde la amígdala cortical al CPu, nuestros resultados sugieren la presencia de una vía amígdala cortical-CPu con origen en la CxA. Así, el CPu (sobre todo el adyacente al AcbC, ver Fig. 21I; Fig. 29) presenta fibras dispersas, tras la inyección en la CxA y aunque estas fibras podrían provenir de las neuronas del Ba que están afectadas en la inyección en la CxA, siempre se encuentran células marcadas en el CxA más profundo tras las inyecciones en diversas regiones del CPu (Tabla 2). Aunque consideramos confirmada la existencia de dicha proyección, dado que el marcaje anterógrado encontrado (Tabla 5) es consistente con el retrógrado, se necesitan estudios más detallados para conocer con mayor precisión su lugar de terminación.

#### 5.3.1.2.3 Bilateralidad de las Proyecciones Amígdalinas al Estriado

Uno de las observaciones más significativas de este estudio es que todos los núcleos de la amígdala palial profunda presentan proyecciones claramente bilaterales al caudado-putamen, dándose en el caso del Ba una proyección bilateral masiva. Por el contrario, las proyecciones al CPu originadas en el córtex o en el hipocampo, son mayoritariamente homolaterales (Gerfen, 2004). Aunque, en general, como ya hemos dicho los estudios previos no contemplan el marcaje en el hemisferio contralateral, en el trabajo de Kelley et al. (1982) ya se señala la existencia de marcaje de fibras en el

hemisferio contralateral tras diversas inyecciones de aminoácidos tritiados en varios núcleos amigdalinos profundos. Además, también cabe destacar que las proyecciones amigdalinas al caudado-putamen no sólo son bilaterales, sino que también presentan una clara simetría, algo que también ocurre con la proyección al estriado ventral.

### **5.3.2 La Proyección de la Amígdala al Estriado Ventral y la Evaluación Emocional de los Estímulos Quimiosensoriales**

Tal y como hemos visto, la amígdala palial proyecta masivamente al Acb, al Tu, a los CB y a los ICj. La proyección amígdalo-accumbens se considera implicada en procesos relacionados con el refuerzo (Everitt et al., 1999; Baxter y Murray, 2002; ver abajo). Sin embargo, hay mucha menos información sobre la posible función de las proyecciones amigdalinas al resto de estructuras del estriado ventral. A este respecto, nuestros descubrimientos nos permiten extraer dos conclusiones fundamentales. En primer lugar, a pesar de que el Tu muestra un prominente *input* desde los bulbos olfativos que acaba en la capa 1a (Broadwell, 1975; Scalia y Winans, 1975; Shipley y Adamek, 1984), al contrario que otros centros olfativos secundarios (como el córtex piriforme) recibe proyecciones masivas desde la amígdala palial. Estas aferencias proveen *inputs* quimiosensoriales (olfativos y vomeronasales, amígdala cortical y AHA) y estímulos no quimiosensoriales (amígdala basolateral). Dado que las aferencias amigdalinas acaban fundamentalmente en las capas 2 y 3 del Tu, pueden tener una gran influencia sobre la actividad de sus células principales, incluso mayor que la entrada olfativa que es más distal. Por todo ello, el Tu, los CB y los ICj constituyen una porción del estriado ventral que media respuestas a una variedad de estímulos quimiosensoriales y no quimiosensoriales, lo que pone en cuestión la idoneidad del término ‘olfativo’ para designar al Tu.

Por el contrario, aunque los ICj son estructuras para las que no se ha propuesto una función quimiosensorial (a pesar de que la descripción original de Calleja en 1893, se hizo en el contexto del cerebro olfativo), nuestros datos sugieren tal cosa. Como ya hemos discutido, diversos núcleos de la amígdala palial proyectan a los ICj. Sin embargo, la proyección desde el COApm termina, de modo masivo y específico, en el neuropilo central del ICj y en la porción interna del ICjM. Dada la compleja estructura y composición celular de los ICj (Fallon et al., 1978; 1982; Fallon, 1983), es difícil dar una

interpretación funcional clara a estos datos. No obstante, los estudios de morfología neuronal en la rata con la impregnación de Golgi (Fallon et al., 1978) sugieren que la zona neuropilar de los ICj está ocupada casi exclusivamente por los árboles dendríticos de las neuronas internas de tamaño medio. Contrariamente a las células granulares que conforman la mayor parte del ICj y que son interneuronas o proyectan a zonas vecinas del Acb, las neuronas internas de tamaño medio parecen tener axones mielinizados, lo que sugiere que proyectan a distancia, como de hecho demuestran experimentos de trazado en ratas (Fallon, 1983). Por lo tanto, nuestros resultados indican que los islotes de Calleja participan en el procesamiento de la información vomeronasal y que el *input* vomeronasal desde la amígdala cortical posterior puede acabar directamente sobre las células principales (de proyección) de los mismos.

Así pues, nuestros descubrimientos sugieren que el Tu medial y las estructuras adyacentes (CB y ICj), como partes del estriado ventral (Zahm y Heimer, 1987), están muy probablemente implicadas en mediar respuestas afectivas de tipo refuerzo/atracción desencadenadas por señales químicas. Esto viene refrendado por el hecho de que tanto la estimulación eléctrica (Prado-Alcala y Wise, 1984), como la administración de drogas adictivas (Kornetsky et al., 1991; Stein y Fuller, 1992; Porrino et al., 2002; Ikemoto et al., 2005; Sellings et al., 2006) en el Tu son reforzantes, al igual que lo es la estimulación eléctrica en la amígdala (Prado-Alcala y Wise, 1984; Kane et al., 1991). Dado que la porción medial del Tu y los CB y los ICj vecinos, incluido el ICjM, reciben proyecciones específicas desde la amígdala palial vomeronasal (COApm y AHA), es probable que estas proyecciones amígdalo-estriatales medien respuestas de refuerzo frente a señales químicas de conoespecíficos (vomeronasales y/o olfativas), entre otros estímulos.

A este respecto, Ikemoto (2003) demostró, usando diferentes aproximaciones experimentales, que las intensas propiedades reforzantes de la cocaína se deben, al menos en parte, a su acción como agonistas dopaminérgicos en el límite entre el Tu medial y el MAcbSh. Esto podría estar relacionado con el hecho de que la cocaína también actúa como agonista serotoninérgico sobre receptores 5HT-2A (ver Bubar y Cunningham, 2006), que se expresa en niveles muy elevados en las células de la capa 3 del Tu y, especialmente, en las células de los ICj (Mijnster et al., 1997; Jansson et al., 2001). Ya que la amígdala cortical posterior y el AHA proyectan específicamente sobre estas estructuras, las propiedades adictivas de la cocaína en roedores podrían deberse a su habilidad de

imitar o modular los efectos reforzantes de las señales químicas (y tal vez de otros estímulos) por medio de su acción sobre el Tu medial, los CB y los ICj. Por todo esto, las proyecciones desde la amígdala al Tu/CB/ICj podrían mediar tanto los efectos reforzantes de las señales químicas como las propiedades adictivas de la cocaína. Se requieren todavía más experimentos para testar esta posibilidad.

Las proyecciones desde la amígdala basolateral al estriado ventral están implicadas en la expresión de comportamientos de tipo refuerzo/atracción hacia reforzantes secundarios. Así, las lesiones de la amígdala basolateral afectan a la adquisición de preferencia de lugar (Everitt et al., 1991) y a la ejecución de acciones instrumentales dirigidas a la adquisición de un refuerzo secundario condicionado tras su asociación con sexo (Everitt et al., 1989) o agua (Cador et al., 1989) como reforzantes incondicionados (primarios). Además, el condicionamiento Pavloviano de segundo orden también se ve afectado por lesiones del núcleo accumbens (Parkinson et al., 1999) o de la división basolateral de la amígdala (Hatfield et al., 1996; Blundell et al., 2001). Estos descubrimientos indican que los procesos de aprendizaje que se dan en la amígdala basolateral dotan a los estímulos neutros de propiedades apetitivas por medio de su asociación con reforzantes primarios. A través de sus proyecciones al estriado ventral, la amígdala basolateral mediaría respuestas apetitivas dirigidas a estos “nuevos” estímulos atractivos.

A este respecto, nuestro grupo ha demostrado en ratones hembras que los olores (volátiles) de machos no son innatamente atractivos pero llegan a serlo tras su asociación con feromonas masculinas no volátiles (e.g. vomeronasal) innatamente reforzantes (Moncho-Bogani et al., 2002; Martínez-Ricós et al., 2007). Esta asociación de estímulos olfativos y vomeronasales podría ocurrir en la amígdala basolateral, ya que la amígdala cortical (o el córtex piriforme; McDonald, 1998) y la amígdala medial (Canteras et al., 1995) muestran proyecciones convergentes a los núcleos profundos amigdalinos (Pitkänen, 2000; Canteras et al., 1992; resultados no publicados). De hecho, Moncho-Bogani et al. (2005) demostraron en ratones hembra que la exploración de viruta ensuciada por machos (que contiene feromonas sexuales innatamente reforzantes) no sólo activa los sistemas vomeronasal y olfativo sino también centros del circuito cerebral del refuerzo, incluyendo partes de la amígdala basolateral y del área periférica medial del accumbens. Además, la exploración de los olores de macho que han llegado a ser

atractivos tras su asociación con las feromonas sexuales de macho no volátiles (detectadas por el órgano vomeronasal), activa algunos centros olfativos secundarios (pero no vomeronasales) así como la amígdala basolateral (Moncho-Bogani et al., 2005), el córtex orbitofrontal y al área ventral tegmental. Estos descubrimientos sugieren que la amígdala basolateral podría mediar la asociación de olores con feromonas y, por medio de sus proyecciones al estriado ventral, participar en respuestas dirigidas a los olores, que actuarían como reforzantes condicionados en comportamientos apetitivos. Se ha propuesto un papel similar de la amígdala basolateral en la asociación de estímulos olfativos y gustativos implicada en la elaboración de respuestas alternativas excluyentes de tipo *go-no go* (Schoenbaum et al., 1999).

### **5.3.3 La Proyección de la Amígdala al Caudado-Putamen y sus posibles Implicaciones Funcionales**

Numerosos estudios han demostrado que el CPu es una estructura funcionalmente heterogénea en sus ejes rostro-caudal y dorso-ventral (Drevets et al., 2001; White y McDonald, 2002; Martínez et al., 2003; Fudge et al., 2004). De hecho, en primates, se ha propuesto una subdivisión funcional basada en las aferencias cortico-estriatales que distingue entre regiones motora, asociativa (cognitiva) y límbica (emocional) (Joel y Weiner, 1994, 2000; Parent, 1990; Parent y Hazrati, 1993, 1995). Datos recientes en la rata sugieren que existe una regionalización del CPu similar a la encontrada en primates (Reep et al., 2003). Aunque existen datos parciales de la localización de la porción límbica del CPu en rata, nuestros datos sobre las aferencias amigdalinas indican que, al menos la parte más caudal y la parte ventral cercana al Acb deben formar parte de la subdivisión límbica del CPu. Además es destacable que el núcleo basal da lugar a una proyección sobre el CPu dorso-medial que parece terminar en parte de la región asociativa del CPu (Gerfen, 2004). En ninguno de los casos las proyecciones desde los núcleos amigdalinos al CPu acababan en la región rostral y dorso-lateral del CPu, región que recibe mayoritariamente aferencias desde la corteza motora (Gerfen, 2004).

La porción caudal del CPu ha recibido menor atención pero existen numerosas evidencias de que es más parecida, en muchos aspectos, al estriado ventral que al resto del CPu dado que presenta características histoquímicas (Fudge y Haber, 2002) y conectivas

(Fudge et al., 2004; capítulo 5) similares a las del núcleo accumbens. Esta porción del CPu parece intervenir en el condicionamiento consistente en asociar un estímulo auditivo a la ausencia de *shock* (*safety conditioning*) pero no en el condicionamiento al miedo (*fear conditioning*) ya que media componentes afectivos positivos o de refuerzo de señales de seguridad (Rogan et al., 2005). Nuestros datos anatómicos en ratones sugieren que las proyecciones desde la amígdala a esta porción del CPu podrían intervenir en el procesamiento del valor reforzante de algunos tipos de señales, como se ha demostrado para el caso de señales indicativas de que un determinado contexto es seguro (Rogan et al., 2005).

Estudios de comportamiento llevados a cabo por Amorapanth et al. (2000) han demostrado que en un paradigma comportamental de condicionamiento al miedo en el que se permite el escape, las lesiones del núcleo central afectan a la respuesta reactiva (reacción de parálisis o *freezing*), pero no a la respuesta activa (escape), mientras que las lesiones del núcleo basal hacen lo contrario. En el caso de las lesiones del núcleo lateral de la amígdala se ven afectadas ambas respuestas. Según estos autores, las proyecciones del núcleo lateral de la amígdala sobre el núcleo central son las responsables de desencadenar la respuesta reactiva mientras que las proyecciones sobre el núcleo basal son las que median la respuesta activa. Además, nuestros resultados nos permiten afirmar que tanto el B como el L proyectan sobre el CPu, estructura que se ha implicado en la ejecución de respuestas motivacionales planeadas (Haber et al., 2006). Por tanto, los resultados de Amorapanth et al. (2000) podrían interpretarse en este contexto, ya que parece lógico sugerir que una respuesta motivacional planeada como es el escape pueda estar mediada por las conexiones del B y del L sobre el CPu límbico y asociativo.

# Capítulo 6

## DISCUSIÓN GENERAL

## 6.1 LA AMÍGDALA EN LOS VERTEBRADOS AMNIOTAS

### 6.1.1 Territorios en la Amígdala Palial de los Mamíferos

Los derivados paliales ocupan la superficie dorsal de los hemisferios cerebrales, desde la línea media hasta el surco ventricular lateral. Generalmente se asume que el córtex está compuesto por tres áreas, derivadas del palio embrionario medial, dorsal y lateral respectivamente. En el cerebro de mamíferos esto encaja con la clasificación clásica del córtex en tres regiones citoarquitectónicamente distinguibles. Desde medial a lateral encontramos el arquicórtex con una única capa celular intercalada entre dos capas plexiformes (formación hipocámpica), el isocórtex (o neocórtex) con 5-6 capas celulares y una capa molecular por encima de la sustancia blanca, y el paleocórtex (córtex olfativo) caracterizado por una capa molecular superficial (I) y dos capas celulares (además del núcleo endopiriforme). El hecho de que los límites entre esas áreas no sean claros hace que tengamos que considerar la existencia de áreas corticales de transición. Además, las regiones más laterales del palio protruyen en la amígdala.

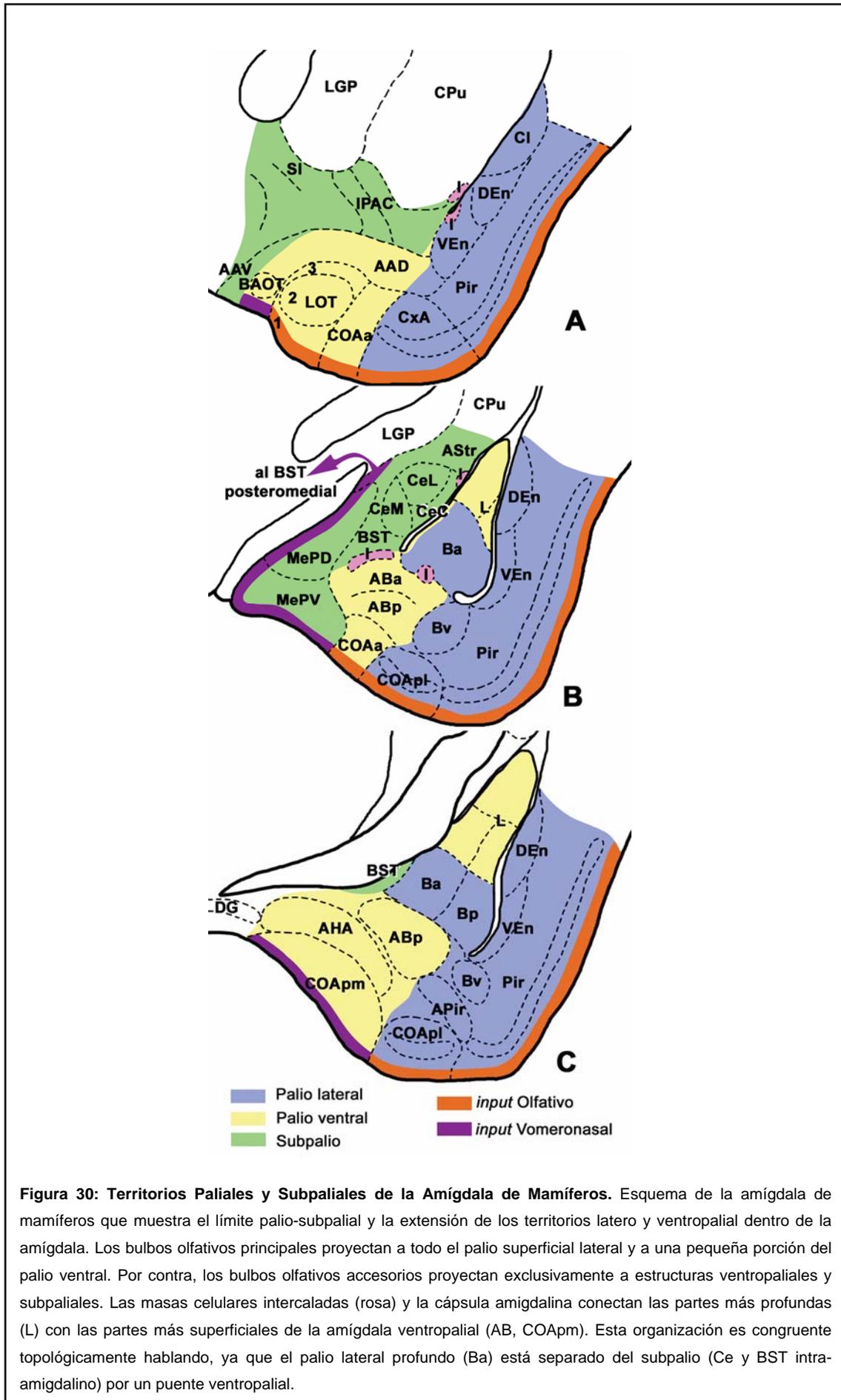
La expresión de genes morfogenéticos en embriones de vertebrados reveló una inesperada heterogeneidad en la región lateral del palio (Puelles et al., 2000; Medina et al., 2004). Esto condujo a la identificación de una cuarta región palial, el palio ventral, considerado previamente por Smith-Fernández et al., (1998) como una zona intermedia entre el palio y el subpalio. El palio ventral se definió por un patrón de expresión de genes que incluía diversos marcadores paliales (Tbr-1 y una banda juxtaventricular de Pax-6) pero que excluía Emx-1 (Puelles et al., 2000). Hibridaciones *in situ* en embriones de ratón de 15 días de edad indican que la amígdala incluye derivados ventropaliales junto con porciones de palio lateral (Puelles et al., 2000; Puelles, 2001b). Medina et al. (2004) refinaron aún más este análisis y demostraron que durante el desarrollo embrionario tardío, los territorios paliales laterales y ventrales muestran un patrón diferencial de expresión de genes (palio lateral: Cadherina 8 y Emx-1; palio ventral: Dbx-1, Neurogenina y Semaforina 5A).

Desde un punto de vista comparado, es clave asignar al palio lateral o ventral cada una de las áreas y núcleos de la amígdala palial, ya que, los derivados del palio ventral embrionario de mamíferos sólo podrán ser homólogos de estructuras ventropaliales de los no mamíferos, y lo mismo para los derivados lateropaliales. Los datos sobre la expresión

de genes homeóticos durante el desarrollo embrionario, derivados de los estudios mencionados (ver Puellas, 2001b; Medina et al., 2004) indican que los únicos derivados lateropaliales de la amígdala son el B y el COApl. Además, los territorios de transición localizados entre la amígdala cortical y el córtex piriforme/entorrinal (CxA, APir, TR), deben pertenecer al palio lateral para que el esquema sea consistente desde el punto de vista topológico.

Un análisis de la topología de la amígdala de mamíferos indica que el resto de áreas y núcleos de la amígdala palial son ventropaliales, ya que son adyacentes a territorios estriatales. De este modo, la división ventropalial de la amígdala cortical está formada por el LOT, COAa, BAOT y COApm. Además, el L y el AB constituyen la amígdala ventropalial profunda. Así, el L es adyacente a derivados estriatales como el caudado-putamen, la transición estriado-amigdalina y la amígdala central. Por su parte, el AB y tal vez sus vecinos rostral (AA dorsal) y caudal (AHA), son adyacentes al Me (divisiones anterior o posterior) y a la porción intraamigdalina del núcleo de la *stria terminalis*. Topológicamente el B (lateropalial) y el Ce (estriatal) deberían estar separados por una banda de territorio ventropalial, constituida probablemente por la cápsula amigdalina y las masas celulares intercaladas paracapsulares posteriores de la amígdala (Medina et al., 2004).

Esto proporciona un esquema de la amígdala palial de los mamíferos (Fig. 30) en el cual cada núcleo o área pertenece a un compartimento en función de su localización superficial o profunda así como de su naturaleza ventropalial o lateropalial. Este análisis simple de la topología está avalado por los datos de la expresión de genes homeóticos durante el desarrollo embrionario (Puelles, 2001b; Medina et al., 2004). En este esquema hemos incluido igualmente las aferencias desde los bulbos olfatorios principal y accesorio, basándonos en datos obtenidos con diversas técnicas (Scalia y Winans, 1975; von Campenhausen y Mori, 2000; Mohedano-Moriano et al., 2007).

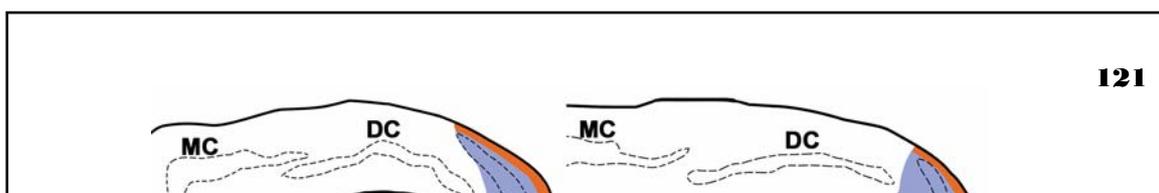


### 6.1.2 Territorios en la Amígdala Palian de los Reptiles

Ya que las proyecciones desde el bulbo olfativo acaban en las capas superficiales del palio ventral y lateral, analizaremos específicamente la naturaleza ventropalial o lateropalial de la amígdala palial en reptiles. A este respecto, es sensato considerar al LC, al DLA y al dLC como estructuras lateropaliales. De hecho, ninguna de estas estructuras está en contacto con ningún territorio estriatal. Por otro lado, en su definición original de palio ventral, Puelles et al. (2000) indicaban que estaba compuesto por estructuras profundas al Nlot. Por ello, es razonable sugerir que el Nlot y su continuación caudal, la VAA y el NS, sean derivados ventropaliales. Finalmente, también es muy probable que las estructuras profundas a estas áreas corticales (PDVR, LA y VPA) sean ventropaliales (Martínez-García et al., 2002a). Esta propuesta es coherente desde el punto de vista topológico dado que los presuntos derivados ventropaliales están localizados entre los lateropaliales y los derivados no paliales, como el SAT, el BST o la MA. Esta propuesta (Fig. 31) se ve avalada también por los datos sobre la expresión de genes homeóticos durante el desarrollo en tortugas. De hecho, Smith-Fernández et al. (1998) usaron *Emx-1* y *Dlx-1* como marcadores de la regionalización telencefálica temprana y concluyeron que la cresta dorsal ventricular (incluida probablemente su porción posterior) es parte de un territorio intermedio (situado entre el palio y el subpalio) renombrado por Puelles et al. (2000) como palio ventral.

### 6.1.3 Conexiones Amígdalo-Estriatales en Mamíferos y Reptiles

Una vez analizada la presunta naturaleza ventropalial o lateropalial de cada núcleo o área de la amígdala palial en mamíferos y reptiles, se pueden interpretar nuestros datos de las proyecciones en este contexto. Este análisis revela la existencia de patrones similares de conexiones amígdalo-estriatales en reptiles (ver capítulo 4) y mamíferos (ver capítulo 5). En ambos grupos la amígdala palial origina proyecciones al subpalio, que acaban en la amígdala central extendida, en el núcleo accumbens y en el estriado dorsal. Las vías amígdalo-estriatales incluyen proyecciones originadas en núcleos de naturaleza vomeronasal sobre el estriado ventral. Todas estas conexiones se analizan a continuación en detalle.



**Figura 31: Territorios Paliales y Subpaliales de la Amígdala de Reptiles.** Este diagrama, basado en secciones teñidas del hemisferio cerebral izquierdo de *Podarcis hispanica* que muestra el límite palio-subpalial, así como los territorios paliales lateral y ventral, en la amígdala de reptiles. También se indican las áreas de terminación de las proyecciones desde los bulbos olfativos principales (naranja) y accesorios (morado). Al igual que en mamíferos, la proyección olfativa alcanza principalmente regiones superficiales lateropaliales y ventropaliales, mientras que la proyección vomeronasal alcanza regiones ventropaliales (NS) y subpaliales (MA). En el cerebro de los reptiles *Squamata* el tracto olfativo accesorio se internaliza (no es superficial) y da lugar a una “invaginación” del córtex vomeronasal que resulta en la aparición del NS, que por lo tanto, muestra una laminación invertida, por ello, el VPA es profundo al NS. Por otro lado, la proyección olfativa cursa a través de la *stria medullaris*, justo superficial al MA, y alcanza el hemisferio contralateral vía la comisura habenular.

### ***6.1.3.1 Proyecciones de la Amígdala Palial a la Amígdala Central Extendida y al Núcleo Accumbens***

En mamíferos hay dos grupos de proyecciones desde la división basolateral a territorios subpaliales, una proyección que alcanza a la amígdala central extendida y a partes del estriado ventral y una proyección al estriado dorsal. Algunas de estas proyecciones se consideran parte de los circuitos intra-amigdalinos, ya que terminan fundamentalmente en la amígdala central y se originan en porciones de los núcleos basal (Savander et al., 1995), lateral (Pitkänen et al., 1995; Pitkänen y Amaral, 1998) y basal accesorio (Petrovich et al., 1996; Savander et al., 1996). Estas proyecciones acaban no sólo en el núcleo central de la amígdala sino que también lo hacen en diferentes porciones del núcleo de la *stria terminalis* (Dong et al., 2001) así como en áreas estriado-palidales adicionales del prosencéfalo basal como el núcleo intersticial de la rama posterior de la comisura anterior y la *substantia innominata* sublenticular. Todas estas estructuras están incluidas en el concepto de amígdala central extendida (Alheid et al., 1995).

Algunas de estas proyecciones de los núcleos amigdalinos profundos a la amígdala central extendida se extienden rostralmente alcanzando el área periférica medial del núcleo accumbens. De hecho, algunos núcleos profundos de la amígdala como el basal accesorio, basal (Groenewegen et al., 1980; Kelley et al., 1982; Russchen y Price, 1984; Brog et al., 1993; Petrovich et al., 1996; Wright et al., 1996; ver resultados del capítulo 5), lateral (resultados del capítulo 5) y la transición amígdalo-hipocámpica (resultados del capítulo 5) proyectan al núcleo accumbens, estructura que muestra características comunes (principalmente histoquímicas) con la amígdala central extendida (Alheid et al., 1995; Zahm, 1998).

Tanto si el núcleo accumbens constituye el extremo rostral de la amígdala extendida como si no, los núcleos basal, basal accesorio y lateral amigdalinos y la transición amígdalo-hipocámpica de mamíferos proyectan a un continuo de estructuras que incluyen a la amígdala central, al núcleo de la *stria terminalis* (dorsolateral) y al núcleo accumbens (McDonald, 1991), así como a diversas estructuras estriado-palidales ventrales adicionales. Esto recuerda claramente a la situación en reptiles donde porciones de la amígdala palial, que incluyen el DLA, partes de la PDVR, el VAA profundo, el LA, el dLC y el VPA (ver resultados del capítulo 4), proyectan a un continuo de estructuras

dentro del telencéfalo subpalial que incluye el Acb y SAT. Esto apoya la idea, ya apuntada por Bruce y Neary (1995a) y Lanuza et al. (1997; 1998) de que la PDVR y estructuras adyacentes en los hemisferios cerebrales caudales de reptiles constituyen el homólogo de la división basolateral de la amígdala de mamíferos (Martínez-García et al., 2002a).

Además de los núcleos profundos, algunos de los núcleos de la amígdala palial superficial también inervan porciones del estriado ventral. En este sentido, tanto el área cortical amigdalina anterior (COAa) y la transición cortico-amigdalina (CxA) de los mamíferos como la VAA de los reptiles presentan proyecciones considerables al núcleo accumbens.

### ***6.1.3.2 Proyecciones de la Amígdala Palial al Estriado Dorsal***

La segunda vía amígdalo-estriatal del prosencéfalo de mamíferos es una importante proyección al estriado dorsal (caudado-putamen) que se origina fundamentalmente, aunque no exclusivamente, en el núcleo basal de la amígdala (Kelley et al, 1982; Russchen y Price, 1984; Wright et al., 1996; ver el capítulo 5). En reptiles, el estriado dorsal recibe un *input* masivo desde el DLA (ver resultados del capítulo 4). Esto señala al DLA de reptiles como el homólogo del núcleo basal de la amígdala de mamíferos. Nuestros datos indican que las proyecciones del DLA al estriado dorsal y ventral, al igual que las que se originan en el núcleo basolateral de la amígdala de mamíferos (Kelley et al., 1982; Brog et al., 1993; ver datos del capítulo 5 en mamíferos) tienen una notable componente contralateral. Esta homología está además apoyada por características histoquímicas (densa inervación AChasa y dopaminérgica) y embriológicas (presunta naturaleza lateropalial; Martínez-García et al., 2002a) que comparten el DLA de reptiles y el núcleo basolateral de la amígdala de mamíferos.

En resumen, tanto en mamíferos como en reptiles, los derivados lateropaliales profundos de la amígdala (B en mamíferos; DLA en reptiles) proyectan específicamente y de manera masiva (y bilateral) tanto al estriado dorsal como al continuo estriado ventral-amígdala central extendida (Martínez-García et al., 2007a, resultados de los capítulos 4 y 5), mientras que los núcleos amigdalinos ventropaliales profundos proyectan mayoritariamente sobre el estriado ventral (ABa y AHA en mamíferos; LA, parte de la PDVR dorso-lateral y VPA en reptiles) y sobre su continuación caudal (amígdala central extendida). Sin embargo, hay una porción de la amígdala ventropalial profunda (L y ABp

en mamíferos; partes de la PDVR medial y LA) que proyecta tanto al estriado dorsal como al estriado ventral.

La porción de la cresta dorsal ventricular receptora de las proyecciones sensoriales del tálamo (ADVR) constituye según algunos autores (Bruce y Neary, 1995), una región de la amígdala lateral de aves y reptiles. Nuestros datos sobre las proyecciones amígdalo-estriatales en reptiles indican que, aunque la ADVR proyecta fundamentalmente al estriado dorsal (ver resultados capítulo 4) sí se observa una proyección menor al estriado ventral, lo que es consistente con la hipótesis de Bruce y Neary (1995).

### ***6.1.3.3 Proyección Vomeronasal desde el Córtex Amigdalino al Límite entre el Núcleo Accumbens y el Tubérculo Olfativo***

El patrón de las proyecciones amígdalo-estriatales se completa con las proyecciones que se originan desde la amígdala vomeronasal y que terminan en el estriado ventral. En reptiles *Squamata* estas proyecciones se encuentran representadas por la proyección masiva desde el córtex vomeronasal, el llamado núcleo esférico, al ‘*olfactostriatum*’ descrita en serpientes (Lanuzza y Halpern, 1997; Martínez-Marcos et al., 2005), proyección que también está presente (aunque en mucha menor medida) en *Podarcis* (ver resultados del capítulo 4). En roedores, el núcleo posteromedial cortical de la amígdala (presunto homólogo del núcleo esférico; Martínez-García et al., 2002a) da lugar a una proyección relativamente menor (si se compara con las proyecciones desde la amígdala basolateral) pero conspicua al accumbens (Canteras et al., 1992; Gomez y Newman, 1992; Brog et al., 1993; Canteras et al., 1995) que termina fundamentalmente en el área periférica medial del accumbens, en donde parece alcanzar de forma masiva a los puentes celulares del estriado ventral y los islotes de Calleja antero-mediales, además de las porciones adyacentes del Tu (ver resultados del capítulo 5). Nuestros datos sugieren que el ‘olfatoestriado’ podría estar representado en el cerebro de los mamíferos por los puentes celulares y los islotes de Calleja antero-mediales, además de por las porciones adyacentes del Tu, que reciben las proyecciones desde el COApm. De hecho, al igual que el olfatoestriado de ofidios, las porciones mediales de los CB, los ICj y el Tu muestran una innervación de fibras inmunoreactivas para el neuropéptido Y de moderada a densa (Riedel et al., 2002). Además, hay células en el Tu y los ICj que expresan receptores 5-hidroxitriptamina-2A (Mijnster et al., 1997; Jansson et al., 2001). Aunque estos datos

apoyarían esta homología, es interesante señalar que los CB, los ICj y el Tu muestran una elevada densidad de axones TH-inmunoreactivos (Seifert et al., 1998; Riedel et al., 2002), mientras que el olfatoestriado de ofidios muestra una inervación de fibras TH-inmunoreactivas comparativamente más escasa (Martínez-Marcos et al., 2005).

#### **6.1.4 La Amígdala Palial de Reptiles y su Comparación con la de Mamíferos: Una Propuesta de Homologías**

Estos análisis nos permiten hacer una propuesta de homologías entre la amígdala de reptiles y de mamíferos basada en la topología (posición superficial o profunda en territorios ventro o lateropaliales), las conexiones (desde los bulbos olfativos, al estriado...) y la histoquímica, que se presenta en la Tabla 6. De acuerdo con esta propuesta, partes del LC caudo-ventral de reptiles (lateropalial y superficial) serían homólogas del COApl así como de, tal vez, el área de transición con el córtex entorrinal (TR) de mamíferos, ya que comparten ciertas características con éstos, a saber, sus proyecciones intra-amigdalinas y a la formación hipocámpica (mamíferos, Majak y Pitkanen, 2003; reptiles, Hoogland y Vermeulen-Vanderzee, 1995). A su vez, el DLA de reptiles (lateropalial y profundo) es el mejor candidato para el homólogo del B y el APir de mamíferos, ya que además de compartir su origen embrionario y ubicación topológica, comparten sus proyecciones bilaterales al estriado (ventral y dorsal) y al LOT, así como una la inervación dopaminérgica (mamíferos, Brinley-Reed y McDonald, 1999; reptiles, Andreu et al., 1994; Martínez-García et al., 2007a) y colinérgica (mamíferos, Hecker y Mesulam, 1994; reptiles, Medina et al., 1993; Lanuza et al., 1997). La aparente naturaleza lateropalial del dLC (tal y como indica su nombre, profunda al córtex lateral) y su posición rostral al DLA, sugieren que su homólogo en mamíferos puede encontrarse en una región anterior al núcleo basolateral amigdalino. Dos estructuras parecen las candidatas más probables a homólogo del dLC en mamíferos. Por un lado, algunas partes del núcleo endopiriforme (Brog et al., 1993) y/o del Bv (nuestros resultados) proyectan, aparentemente al *accumbens* aunque esta proyección no ha sido totalmente confirmada mediante el trazado anterógrado (Behan y Haberly, 1999). Alternativamente, el dLC podría ser comparable al córtex insular/perirrinal. Esto viene apoyado por el hecho de que estas áreas corticales muestran proyecciones masivas al *accumbens* (Brog et al., 1993; nuestros resultados en ratones), al núcleo de la *stria terminalis* y a la amígdala central (McDonald et

al., 1999; nuestros datos en ratones). Además, el dLC de lagartos (Martínez-García et al., 2002b) y el córtex insular/perirrinal de mamíferos (Yasui et al., 1989) también

**Tabla 6: Propuesta de Homologías entre los Núcleos y Áreas Amigdalinas Paliales de Mamíferos, Reptiles y Aves.** Resumen de las principales propiedades de los diferentes núcleos de la amígdala palial. En las columnas en las que se describen los principales *inputs* y *outputs*, el término intrínseco se usa para hacer referencia a la existencia de conexiones con otros núcleos de la amígdala palial. La mayoría de estas proyecciones se originan en la amígdala cortical y alcanzan los núcleos amigdalinos profundos (división basolateral). Además, hay un complejo grupo de interconexiones entre los diferentes subnúcleos de la división basolateral de la amígdala.

Origen Embriológico	Posición Topológica	Área/Núcleo en Mamíferos	Área/Núcleo en Reptiles	Propiedades	Área/Núcleo en Aves
<i>Pallium lateral</i>	Superficial	COApl, CxA, TR	Partes del LC?	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proyecciones principalmente intra-amigdalinas y a la formación hipocámpica</li> </ul>	Partes del CPI?
	Profunda	B, APir	DLA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proyecciones bilaterales al estriado ventral, dorsal y al LOT</li> <li>• Innervación dopaminérgica + colinérgica</li> </ul>	NC lateral TPO AD PoA lateropalial
<i>Pallium ventral</i>	Superficial	LOT	Nlot	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Conectado con la amígdala lateropalial profunda</li> <li>• Innervación colinérgica</li> </ul>	AA
		COAa	VAA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proyecciones al estriado ventral</li> <li>• Proyecciones al hipotálamo lateral</li> </ul>	Área olfato-receptora del arcopalio ventral al CPI
		COApm	NS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Córtex Vomeronasal</li> <li>• Proyecciones al olfatoestriado* * ICj, CB en mamíferos</li> </ul>	---
	Profunda	L	PDVR dorsomedial (ADVR?)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interfaz sensorial</li> <li>• Proyecciones Intra-amigdalinas</li> <li>• Pocas proyecciones extra-amigdalinas (al estriado ventral y dorsal)</li> </ul>	NC medial (campo L, N intermedio y frontal, E, Bas)
		ABa	VAA profundo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proyecciones al estriado ventral</li> <li>• Proyecciones al hipotálamo lateral</li> </ul>	AV rostralateral profundo al arcopalio olfato-receptor
		ABp	partes de la PDVR + LA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proyecciones al VMH</li> <li>• Proyecciones al estriado ventral y dorsal</li> </ul>	AV posterior, no olfato-receptor
		AHA	VPA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proyecciones al septum ventrolateral</li> <li>• Proyecciones al estriado ventral</li> <li>• Proyecciones al hipotálamo preóptico</li> <li>• Interconectado con el hipotálamo premamilar ventral</li> </ul>	PoA ventropalial / extremo caudal del AV * La aves carecen de un grupo celular que exprese receptores a esteroides sexuales * Receptores a hormonas esteroideas

comparten una aferencia específica rica en el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), característica que no se da en el núcleo endopiriforme.

Se necesitan más estudios acerca de las características hodológicas, embriológicas e histoquímicas del palio lateral de mamíferos para comprobar esta hipótesis. En este

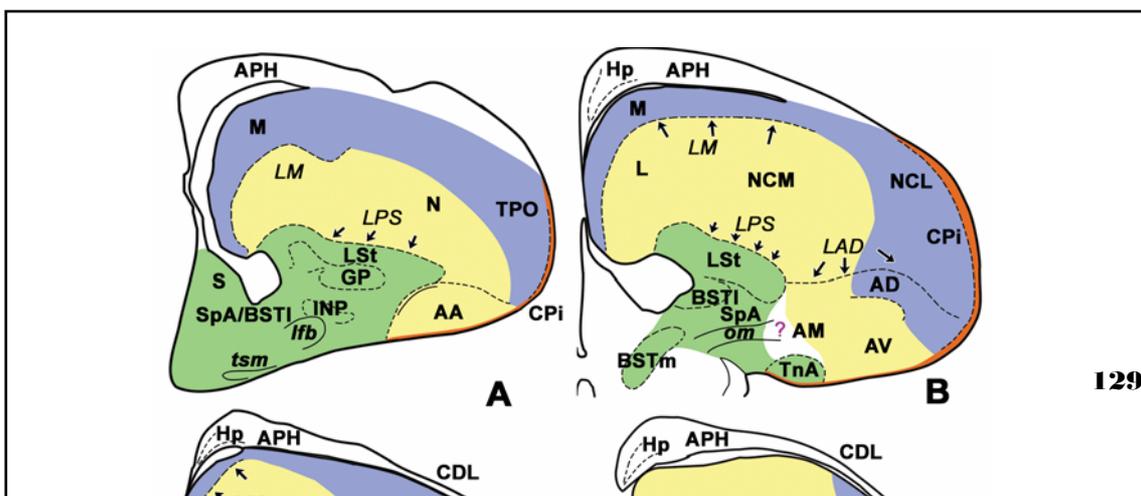
sentido habría que revisar la asunción de que el córtex piriforme es de naturaleza lateropalial, dado que, a niveles anteriores, su porción ventral (profunda al tracto olfativo lateral) podría ser, por definición, ventropalial. Otras estructuras supuestamente lateropaliales de mamíferos, como el córtex entorrinal, también podrían ser de origen palial heterogéneo. Esto dificulta la búsqueda de homologías del córtex piriforme y entorrinal en no mamíferos complicando, por lo tanto, la identificación de homólogos en no mamíferos de estructuras adyacentes, menos estudiadas, como el núcleo endopiriforme y las áreas corticales de transición (insular, perirrinal y ectorrinal).

En el palio ventral, el Nlot y el Naot serían homólogos del LOT y del BAOT de mamíferos. Además, las áreas ventropaliales olfativas de mamíferos (COAa) y de reptiles (VAA) podrían ser homólogas, lo que vendría avalado por características comunes tales como las proyecciones al estriado ventral (este trabajo) o las proyecciones al hipotálamo lateral (Petrovich et al., 1996; Lanuza et al., 1997). Del mismo modo, las cortezas vomeronasales de mamíferos (COApm) y de reptiles (NS), también serían homólogas. En cuanto a los núcleos ventropaliales profundos, la PDVR dorso-medial y quizás la ADVR de reptiles podrían ser homólogos del L de mamíferos, ya que comparten el hecho de ser núcleos de interfaz sensorial (Lanuza et al., 1998), y de que presentan proyecciones principalmente intra-amigdalinas a excepción de las que acaban en el estriado (este trabajo). La porción más profunda del VAA sería la homóloga al ABa ya que comparte con éste sus proyecciones al estriado (este trabajo) y al hipotálamo lateral (Petrovich et al., 1996; Lanuza et al., 1997). La porción ventromedial de la PDVR y la LA son los candidatos más probables a homólogos del ABp de mamíferos, dado que proyectan al núcleo ventromedial hipotalámico (Petrovich et al., 1996; Lanuza et al., 1997) y al estriado (este trabajo). Finalmente, la VPA, por ser un grupo celular profundo al córtex vomeronasal (NS), ocuparía una posición topológica comparable al AHA de mamíferos (que, de hecho, es profundo al COApm). Esto además está apoyado por la continuidad que muestran la LA y la VPA que recuerda a las relaciones entre el AB posterior y el AHA de mamíferos, y por el hecho de que proyectan al hipotálamo preóptico, ventromedial (medial) y premamilar ventral así como al septum ventrolateral (mamíferos, Canteras et al., 1992; reptiles, Lanuza et al., 1997; Font et al., 1997), así como al estriado ventral (este trabajo). Además la AHA de mamíferos y la VPA de reptiles se encuentran entre las estructuras paliales que expresan receptores para esteroides sexuales (mamíferos, Simerly

et al., 1990; Lu et al., 1998; Mitra et al., 2003; en diferentes reptiles: Halpern et al., 1982; Young et al., 1994; Moga et al., 2000; Rhen y Crews, 2001; Tang et al., 2001; Rosen et al., 2002).

### 6.1.5 Identificación de la Amígdala Palial de Aves y sus Divisiones

Como acabamos de discutir la amígdala de mamíferos y de reptiles contiene territorios lateropaliales y ventropaliales. A su vez, estos territorios están formados por estructuras laminares superficiales que reciben proyecciones desde los bulbos olfativos (la amígdala cortical), y centros profundos no laminados (principalmente multimodales), que constituyen su amígdala basolateral. En este apartado intentaremos identificar estos dos componentes paliales en la amígdala de aves e interpretaremos los datos acerca de las conexiones en este contexto. Estos análisis nos permitirán hacer una propuesta de homologías entre la amígdala de aves y la de mamíferos y reptiles que se presenta en la Tabla 6 y en la Figura 32. Las aves carecen de sistema vomeronasal, lo que sin duda ha tenido un gran impacto en la organización de la amígdala. Esto se aprecia fácilmente en las proyecciones desde los bulbos olfativos, que acaban en los centros no paliales, como el tubérculo olfativo rostralmente y el *nucleus teniae* de la amígdala (TnA) caudalmente, y en diversas partes del palio. Éstas incluyen todo el córtex piriforme (CPi) así como áreas superficiales del arcopallio anterior (AA) y dorsal (AD) y de la porción anterior del arcopallio ventral (AV) (Reiner y Karten; 1985; Striedter et al., 1998). A diferencia de lo que ocurre en los restantes vertebrados amniotas, los hemisferios cerebrales caudales de las aves muestran un vacío en la proyección olfativa entre el CPi posterior y el TnA. Esta zona del límite posterior del palio, que como veremos es de origen ventropalial, habría sido el blanco ‘natural’ de las proyecciones desde los bulbos olfativos accesorios. Esta interpretación de la pérdida del *input* vomeronasal a la amígdala, sugiere que las porciones superficiales del AA, AD y AV rostral, constituirían la amígdala cortical de las aves, quizás junto con porciones del CPi más caudal.



De acuerdo con el esquema general de la amígdala de los mamíferos y los reptiles, aquellas estructuras paliales profundas a las áreas corticales olfato-receptoras descritas arriba constituirían la amígdala palial profunda (amígdala basolateral y el AHA) de las aves. La distribución de la glía radial en los hemisferios cerebrales de embriones de pollo (Kalman et al., 1993; 1998; Striedter y Beydler, 1997) sugiere que el AD (arquistriado palial según Striedter y Beydler, 1997), el nidopalio caudolateral (NCL) y el área temporo-parieto-occipitalis (TPO) son topológicamente profundas al CPi, mientras que el AV anterior es profundo a la zona olfato-receptora del arcopalio ventral. Esto fue confirmado combinando el estudio del destino de las células generadas en ciertas zonas de los ventrículos telencefálicos con el marcaje de las proyecciones desde el bulbo olfativo en embriones de pollo (Striedter et al., 1998). Además, tal y como se discute arriba, el núcleo posterior de la amígdala palial (PoA) contiene las estructuras profundas al extremo caudal del CPi y se fusiona sin límites claros con el extremo caudal del AD/AV. Estos datos indican que la amígdala palial profunda de las aves está formada, al menos, por el NCL y el TPO además del arcopalio y la PoA.

Aunque las proyecciones olfativas son utilizadas a menudo como marcadores del palio lateral (Striedter et al., 1998), los datos procedentes de la anatomía de mamíferos (y

reptiles) revisados arriba indican que las áreas corticales olfato-receptoras incluyen derivados tanto lateropaliales como ventropaliales. Esto quedó corroborado por el patrón de expresión de genes homeóticos en los hemisferios cerebrales de aves (Smith-Fernandez et al., 1998), que indican que el M tiene un origen lateropalial y el N (nidopalio), al menos su porción anterior, un origen ventropalial. Utilizando una aproximación similar y un análisis anatómico más fino, Puelles et al. (2000) mapearon los territorios lateropaliales y ventropaliales en los hemisferios cerebrales caudales de embriones de pollo. De acuerdo con sus resultados y su interpretación de los hemisferios cerebrales de las aves, los territorios ventropaliales embrionarios dan lugar al N rostral, incluyendo el entopalio (E, anteriormente llamado ectoestriado) y el núcleo basorostral palial (Bas; anteriormente llamado núcleo basal) así como el nidopalio caudomedial, incluido el campo L. Además, el AV (clásicamente llamado arquiestriado intermedio ventral) también muestra un perfil de expresión génica típico del palio ventral que se extiende caudalmente hasta lo que muchos autores consideran la PoA.

Por otro lado, el palio lateral incluye el CPi, y las estructuras topológicamente profundas a él, a saber, el M y el AD. Además, el palio lateral parece protruir en el PoA. Tal y como ya se ha apuntado previamente (Martínez-García et al., 2002a), la topología y la citoarquitectura sugieren la existencia de un puente lateropalial que conecta el palio lateral rostral (M) con el palio lateral caudal (AD). Este puente está probablemente compuesto por la porción lateral del nidopalio caudal, el NCL, además de por el TPO, parte del cual es, de hecho, inmediatamente profundo al CPi. Esta interpretación es consistente con el patrón de expresión de cadherinas en los hemisferios cerebrales embrionarios de pollos (Redies et al., 2001).

La posición del AA (arquiestriado anterior en la terminología clásica) dentro de este mapa requiere de más discusión. De acuerdo con Puelles et al. (2000) y Redies et al. (2001), el AA es parte del subpalio. Sin embargo, nosotros consideramos que la estructura que ellos llaman AA es una porción citoarquitectónicamente distinta del estriado lateral del cerebro de embriones de pollo. Por contra, la mayoría de los neuronanatomistas llaman AA al polo anterior de lo que Puelles et al. (2000) y Redies et al. (2001) marcan como arquiestriado intermedio, más su núcleo del tracto olfativo lateral. Si esta interpretación es correcta, el AA pasa a considerarse una región ventropalial rostral (Fig.

32) estrechamente relacionada con el tracto olfativo lateral (que en aves se denomina tracto fronto-arcopallial, FA; ver Striedter et al., 1998).

El límite palio-subpalial lo dibuja la lámina *pallio-subpallialis*. Sin embargo, a niveles comisurales y post-comisurales, el arcopallio medial (AM) se interpone entre la amígdala subpalial (SpA) y el TnA, y está cruzado por fibras del tracto occipito-mesencefálico (*om*). Ya que la SpA y el TnA son subpaliales, cabría esperar una transición entre territorios ventropaliales y subpaliales a este nivel. La identificación precisa de este límite es una cuestión de suma importancia todavía sin resolver.

### **6.1.6 La Amígdala Palial de Aves y su Comparación con la de Mamíferos y la de Reptiles: Una Propuesta de Homologías**

El mapa de la amígdala palial de aves representado en la Figura 32 sugiere una propuesta de homologías entre los hemisferios cerebrales caudo-laterales de aves y la amígdala palial de mamíferos que es consistente con la topología y que muestra congruencia con el mapa de la amígdala de reptiles propuesto (Tabla 6). De acuerdo con esta propuesta, dentro del palio lateral, el CPi contendría los homólogos de las cortezas olfativas lateropaliales de mamíferos, incluyendo el COApl y las áreas de transición con el córtex piriforme y entorinal (CxA y TR, respectivamente). Las estructuras profundas al CPi en el cerebro de las aves, incluyendo el NC lateral, el TPO, el AD y la PoA lateropalial, serían los presuntos homólogos de la amígdala lateropalial profunda de los mamíferos (el núcleo basal y el APir). Esta propuesta de homología es respaldada por los datos histoquímicos y de conexiones disponibles en aves. Así, los dos estudios de las conexiones paliales al estriado en palomos (Veenman et al., 1995; Kröner y Güntürkün, 1999) indican que los derivados lateropaliales profundos (TPO, NCL, AD, y parte de la PoA) proyectan tanto al estriado ventral como al dorsal. El estudio de Kröner y Güntürkün (1999) sugiere de forma poco explícita, un cierto grado de bilateralidad de las proyecciones al estriado dorsal. Por otro lado, el palio lateral profundo es receptor de una aferencia dopaminérgica (Durstewitz et al., 1999) y colinérgica (Medina y Reiner, 1994).

Las regiones ventropaliales superficiales del telencéfalo de las aves deberían ser homólogas de las áreas corticales olfativas y vomeronasales de la amígdala de mamíferos. El AA es una región ventropalial rostral asociada al tracto olfativo lateral (FA), y consecuentemente constituye el candidato más probable para el homólogo en aves del

LOT de mamíferos. Por otro lado, la porción anterior y superficial del AV, que recibe proyecciones directas desde los bulbos olfativos ocupa una posición en el cerebro de las aves comparable a la del COAa y a la zona de transición (CxA) en la amígdala de mamíferos. El AV/AM anterior profundo parece topológicamente equivalente al ABa de mamíferos, y por lo tanto concebimos ambas estructuras como homólogas. Hay muy pocos datos sobre conexiones de esta zona del telencéfalo de las aves. Tan solo Davies et al. (1997), en su estudio de las conexiones del arquiestriado del pollo, describen una inyección de leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris* que pudiera afectar a esta zona. Los resultados son compatibles con nuestra propuesta de homologías, dado que estas inyecciones dieron lugar a marcaje anterógrado en el estriado ventral y en el hipotálamo lateral. Igualmente, las inyecciones en el estriado ventral de Veenman et al. (1995) y de Kröner y Güntürkün (1999), dieron lugar a marcaje retrógrado en el arcopalio ventral rostral. Así pues, parece que este territorio ventropalial proyecta al hipotálamo lateral y al estriado ventral, como ocurre con el ABa de los mamíferos.

Por contra, a nivel del AV caudal, no existe un córtex superficial olfato-receptor (región denominada arquiestriado posterior por Reiner y Karten, 1985). Como ya hemos discutido, por su posición, la parte superficial de esta zona debería ser el blanco palial de los bulbos olfativos accesorios. Nuestro punto de vista es que, a este nivel, las aves poseen un palio sin elementos corticales superficiales, todo él 'profundo'. Por tanto no se encuentra en aves un córtex vomeronasal equivalente al COApm de mamíferos, pero las estructuras equivalentes a los núcleos profundos (ABp y AHA) se encontrarían bien desarrolladas. A este respecto, la localización de la PoA en el extremo posterior del arcopalio (de ahí su nombre) sugiere que sus porciones ventropaliales son equivalentes al AHA de mamíferos (de hecho, Canteras et al., 1992, lo incluyen en su núcleo posterior de la amígdala), y al VPA de los reptiles.

Esta hipótesis de homología se ve refrendada, nuevamente, por datos de conexiones, que sin embargo son escasos y fragmentarios. Así, como el AHA de mamíferos y el VPA de reptiles, la porción ventropalial del PoA de las aves parece ser el origen de la principal proyección amigdalina al hipotálamo, el llamado tracto occipito-mesencefálico hipotalámico (Zeier y Karten, 1971; ver Figura 14 en Kröner y Güntürkün, 1999). Otras regiones del AV, ligeramente más rostrales, quizás comparables al ABp de la amígdala de los mamíferos, dan lugar a marcaje anterógrado de la vía occipito-

mesencefálica, con menor afectación de su fascículo hipotalámico (Figura 13 en Kröner y Güntürkün, 1999). Por otra parte, como la AHA de mamíferos y la VPA de reptiles, la porción ventropalial del PoA y, en general, el AV posterior, proyectan a una porción del septum lateral ventral (ver Figura 3 en Atoji y Wild, 2004). Se hace necesario realizar estudios detallados de las conexiones amígdalo-hipotalámicas en las aves mediante técnicas de trazado retrógrado para testar y detallar más esta hipótesis de homología.

En todo caso, la desaparición del *input* vomeronasal puede haber resultado en la llegada masiva de otros *inputs* sensoriales que los sustituyan en la comunicación intraespecífica. En este sentido, la presencia de proyecciones masivas desde el telencéfalo auditivo (el *high vocal center* del mesopalio caudal, HVC) al AV caudal en aves canoras (Mello et al., 1998) y no canoras (Wild et al., 1993), si se puede considerar a las palomas aves no canoras, es consistente con nuestra hipótesis. Igualmente lo es, el desarrollo, desde esta zona de la amígdala, de vías descendentes de retorno sobre centros implicados en la audición y el canto (como la corteza del núcleo ovoidal talámico, y el núcleo intercolicular mesencefálico; vía occipito-mesencefálica) y la aparición del núcleo robusto arcopallial, sensible a los andrógenos, en esta zona del cerebro de las aves canoras.

Finalmente, el nidopalio caudomedial (NCM) es la estructura ventropalial más profunda, localizada en la PDVR dorso-medial de aves, y por tanto es un buen candidato a homólogo del L de mamíferos y de la PDVR dorso-medial de reptiles (ver Tabla 6). De hecho, como sus supuestos homólogos en el cerebro de los mamíferos y los reptiles, el NCM es un centro de carácter sensorial, al incluir el campo L (auditivo) y recibir aferencias convergentes de diversos centros sensoriales del palio anterior (Metzger et al., 1998; Kröner y Güntürkün, 1999). Igualmente, esta zona del cerebro de aves posee importantes conexiones intra-amigdalinas (al AV y AD) y sus conexiones extra-amigdalinas se restringen a proyecciones de vuelta a sus *inputs* sensoriales telencefálicos y escasas vías al estriado dorsal y ventral (Metzger et al., 1998; Kröner y Güntürkün, 1999).

Así pues, el análisis de la topología de los hemisferios cerebrales caudales de las aves sugiere una propuesta de homologías que es refrendada por los pocos datos anatómicos e histoquímicos existentes. Este análisis sugiere, además, que el circuito básico de la amígdala se ha mantenido a pesar de la pérdida del *input* vomeronasal. La información vomeronasal ha sido ‘sustituida’ en el circuito amigdalino por entradas de

tipo auditivo y visual, paralelamente al uso de estos estímulos en la comunicación intraespecífica mediante vocalizaciones (canto territorial, de anuncio y de cortejo) y posturas de cortejo (*visual displays*).

### 6.1.7 La Amígdala Subpalial en Mamíferos, Reptiles y Aves

Para poder desarrollar la discusión funcional y evolutiva relativa a la amígdala, tenemos que definir previamente las porciones subpaliales de la misma en todos los amniotas. La tabla 7 muestra la propuesta de homologías en cada uno de los diferentes grupos de animales tratados en este capítulo.

En la amígdala de mamíferos podemos encontrar dos componentes de naturaleza subpalial, a saber, la amígdala extendida (EA) central y la EA medial (Alheid et al., 1995).

**Tabla 7: Propuesta de Homologías entre los Núcleos y Áreas Amigdalinas Subpaliales de Mamíferos, Reptiles y Aves.** Resumen de las principales propiedades de los diferentes núcleos de la amígdala subpalial (amígdala extendida):

Origen Embriológico	Área/Núcleo en Mamíferos	Área/Núcleo en Reptiles	Propiedades	Área/Núcleo en Aves
<i>Subpallium</i>	Central EA	<b>SAT, BSTI</b> *La distribución de CRF y de NT no ha sido adecuadamente estudiada en reptiles	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proyecciones descendentes de larga distancia (e.g. hipotálamo lateral, área parabraquial, complejo vagal dorsal)</li> <li>• células CRF, NT (porción medial)*</li> <li>• innervación CGRP (porción lateral)</li> <li>• Proyecciones procedentes de la amígdala</li> </ul>	<b>SpA, BSTL</b> (AM subpalial?)
	Medial EA	<b>MA, BSTm</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proyecciones procedentes del AOB</li> <li>• Proyecciones masivas al hipotálamo preóptico, tuberal lateral (ventromedial) y premamilar</li> <li>• Altos niveles de receptores a esteroides sexuales</li> <li>• Células de proyección que contienen Vasopresina / Vasitocina</li> </ul>	<b>TnA olfato-receptor, BSTM</b> (AM subpalial?)

La EA central está formada por el núcleo central de la amígdala (Ce) y el BST anterior, dorsolateral y posterolateral (con el que está interconectado; Cassell et al., 1999), además de una serie de grupos celulares como el BST supracapsular (Shammah-Lagnado et al., 2000), el núcleo intersticial de la rama posterior de la comisura anterior (Alheid et al., 1999) y la *substantia innominata* sublenticular (Cassell et al., 1999).

La EA central de mamíferos presenta diversas características que pueden ayudarnos a identificar a sus homólogos en los cerebros de reptiles y de aves. Una de las particularidades fundamentales es la presencia de proyecciones descendentes de larga distancia, como las que acaban en el hipotálamo lateral (Price et al., 1991; Bourgeois et al., 2001) o en el área parabraquial o complejo vagal dorsal (Danielsen et al., 1989; Petrovich y Swanson, 1997; Dong y Swanson, 2003; Dong y Swanson, 2004), característica que también presentan la SAT y el BSTl de reptiles (Lanuza et al., 1997; Fig. 15A-B en Martínez-García et al., 2007a) y la SpA, el BSTl (y tal vez la porción subpial del AM) de aves (Berk, 1987; Wild et al., 1990; Atoji et al., 2006). Además la EA central contiene células que co-expresan diversos péptidos (Shimada et al., 1989) como el factor de liberación de la hormona corticotropa (CRF) y la neurotensina (NT). Aunque en aves también encontramos células con las mismas características en los presuntos homólogos de la EA central (Richard et al., 2004; Atoji et al., 1996), en reptiles la distribución de CRF y de NT no ha sido estudiada adecuadamente. Sin embargo, existe una tercera característica de la EA central de mamíferos y es el hecho de que la porción lateral de la EA central presenta una inervación CGRPérgica (Kruger et al., 1988; Yasui et al., 1991) que sí comparten los presuntos homólogos tanto de reptiles (Martínez-García et al., 2002b) como de aves (Lanuza et al., 2000)

Por otro lado, la EA medial de mamíferos está compuesta por el núcleo medial de la amígdala (Me, aunque la porción postero-ventral contiene elementos de naturaleza pial según datos recientes; Choi et al., 2005) y por las porciones del BST con las que el Me está interconectado (a grandes rasgos el BST posterior, Alheid et al., 1985), además de una parte del BST supracapsular (Shammah-Lagnado et al., 2000) y quizás de la *substantia innominata* sublenticular. Al igual que ocurre con la EA central, la EA medial de mamíferos presenta una serie de características que facilitan el reconocimiento de sus presuntos homólogos en reptiles y en aves. Así, la EA medial (Me y BST posteromedial) recibe proyecciones vomeronasales directas desde el AOB (Scalia y Winans, 1975; von Campenhausen y Mori, 2000; Mohedano-Moriano et al., 2007) e indirectas desde la amígdala cortical vomeronasal (COApm + AHA; Canteras et al., 1992). Además la EA medial proyecta masivamente al hipotálamo preóptico, al núcleo ventromedial hipotalámico y al núcleo ventral premamilar; Kevetter y Winans, 1981; Price et al., 1991; Canteras et al., 1995; Dong y Swanson, 2004). Otra de las características de la EA medial

de mamíferos es la presencia de niveles altos de receptores a esteroides sexuales (Pfaff y Keiner, 1973; Warembourg, 1977). Por último la EA medial de mamíferos presenta numerosas células de proyección que contienen Vasopresina/Vasotocina (Wang et al., 1993).

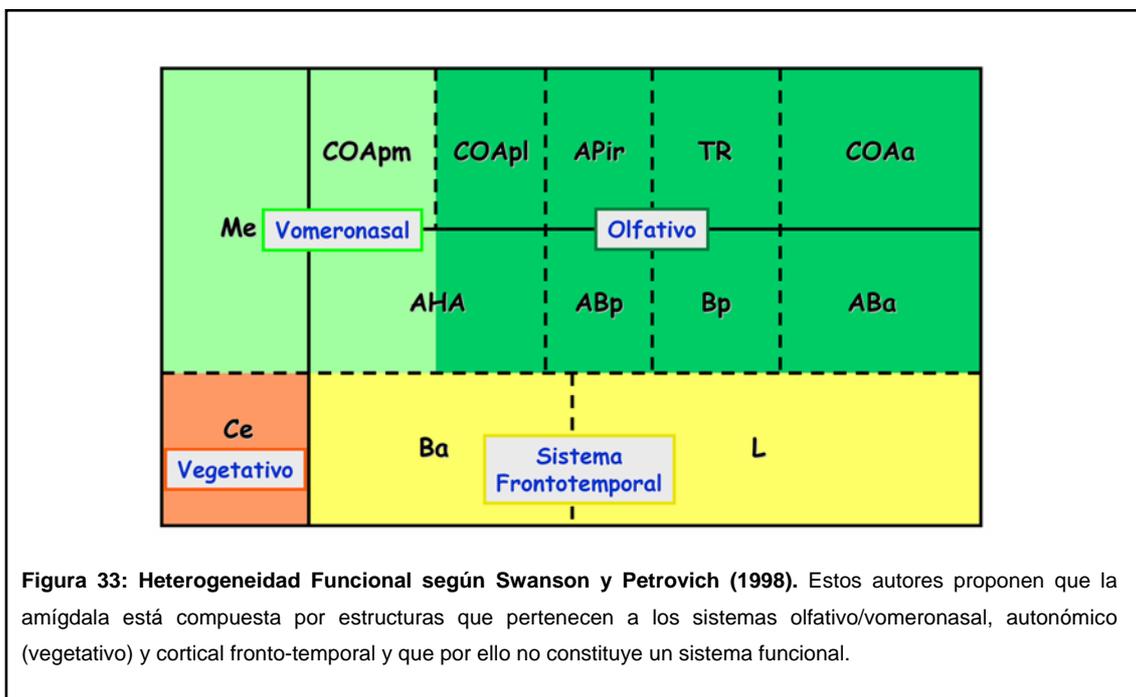
En el cerebro de los reptiles, la EA medial está representada por la amígdala medial (MA) y por un núcleo que parece conectar este grupo celular con el área preóptica medial. Al que algunos autores llaman BST medial. Como su equivalente en mamíferos, la EA medial de reptiles recibe proyecciones vomeronasales directas desde el AOB (Martínez-García et al., 1991; Lohman y Smeets, 1993; Lanuza y Halpern, 1998) e indirectas desde el NS y el VPA (Lanuza et al., 1997; Lanuza y Halpern, 1997). Además, la EA medial de reptiles posee una población de neuronas vasopresinérgicas sexualmente dimórfica (Stoll y Voorn, 1985; Thepen et al., 1987; Smeets et al., 1990), células que expresan receptores a andrógenos (Halpern et al., 1982; Young et al., 1994; Moga et al., 2000; Rhen y Crews, 2001; Rosen et al., 2002) y proyecciones descendentes al hipotálamo medial tuberal y premamilar (Bruce y Neary, 1995a; Lanuza et al., 1997; Martínez-Marcos et al., 1999b). Tal y como sucede en los mamíferos, este grupo celular vasopresinérgico de los reptiles parece originar una inervación sexualmente dimórfica de estructuras clave del circuito prosencefálico del comportamiento socio-sexual, que incluyen el septum lateral ventral y el córtex vomeronasal profundo (AHA en mamíferos, resultados propios no publicados; VPA en reptiles, Stoll y Voorn, 1990).

En las aves, la parte superficial de la EA medial, representada en mamíferos por la amígdala medial, se encuentra reducida a la porción anterior, olfato-receptora, del TnA (Reiner y Karten, 1985). El resto de la EA medial estaría formado por el BSTm (Aste et al., 1998). Aunque las aves carecen de sistema vomeronasal, su EA medial recibe proyecciones del palio ventral caudal, topológicamente equivalente del córtex vomeronasal (Zeier y Karten, 1971; Kröner y Güntürkün, 1999). Además presenta receptores para esteroides (Balthazart et al., 1989; Watson y Adkins-Regan, 1989; Balthazart et al., 1992; Aste et al., 1998; Foidart et al., 1999; Metzdorf et al., 1999), expresa aromatasa (Aste et al., 1998) y muestra una población sexualmente dimórfica de células vasopresinérgicas (Aste et al., 1998; Panzica et al., 2001). Sus conexiones no están muy estudiadas, pero, al menos, algunas inyecciones en el TnA central, sugieren

conexiones con el hipotálamo medial preóptico, tuberal y premamilar (Cheng et al., 1999).

## 6.2 LA AMÍGDALA, FISIOLÓGÍA Y COMPORTAMIENTO

Si consideramos conjuntamente todos los datos discutidos en los capítulos 4 y 5, queda claro que la amígdala tiene una larga historia y que ha experimentado una evolución conservadora a lo largo de la filogenia de los tetrápodos. Esta perspectiva comparada nos permite dar una respuesta afirmativa a una de las cuestiones centrales de la investigación sobre la amígdala, a saber, si esta estructura es un sistema funcional o no (Swanson y Petrovich, 1998) (Fig. 33). Como hemos visto, los reptiles, las aves y los mamíferos muestran grupos similares de centros paliales y subpaliales en los hemisferios cerebrales caudales, que pueden agruparse en dos circuitos principales que se estructuran en dos subsistemas que hemos denominado el central/basolateral y el medial (Fig. 34). A continuación, discutiremos los papeles de estos dos circuitos en la fisiología y el comportamiento.



### 6.2.1 Los Papeles del Subsistema Central/Basolateral

La amígdala extendida (EA) central es uno de los centros diana de proyecciones desde la amígdala basolateral. A este respecto, el L, el B y el AB de mamíferos, y sus

homólogos en el resto de amniotas, proyectan de manera masiva a la EA central. Sin embargo, estas proyecciones también se extienden a otros territorios estriatales, como son el núcleo accumbens y el estriado dorsal. Este sistema es claramente multimodal ya que recibe *inputs* desde centros corticales, talámicos y del tronco del encéfalo, así como diversas aferencias moduladoras (principalmente aminérgicas y colinérgicas). Además, en mamíferos y reptiles recibe *inputs* quimiosensoriales gracias a la presencia de importantes proyecciones desde los núcleos corticales a los profundos dentro de la amígdala, que dirigen los estímulos olfativos y vomeronasales recibidos por la amígdala cortical (superficial) a la amígdala basolateral y central.

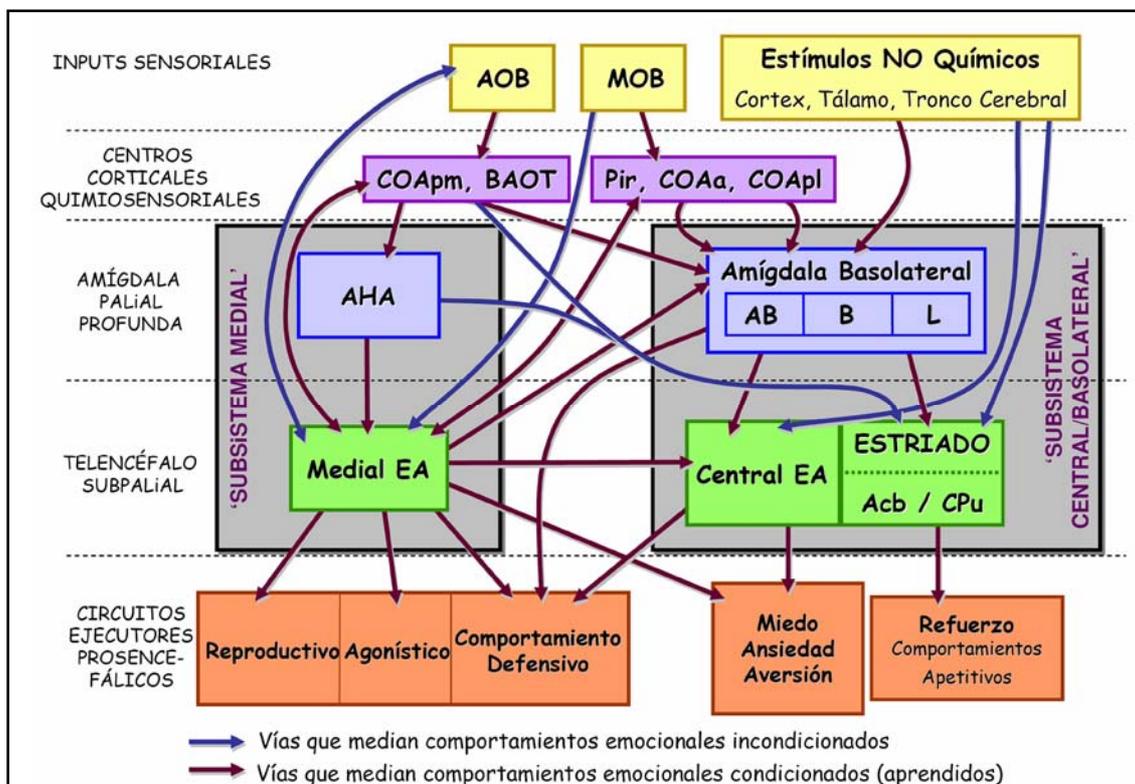
El papel de este circuito ha sido muy estudiado en mamíferos utilizando diferentes enfoques experimentales. El resultado de estos estudios indica que los *outputs* amigdalinos a la EA central median reacciones de miedo/ansiedad a estímulos entrantes, mientras que las vías amigdalostriatales son parte del sistema de refuerzo del cerebro.

#### ***6.2.1.1 Expresión y Adquisición de Miedo/Aversión***

En especies de primates y de otros mamíferos (Roosendaal et al., 1990; Davis y Shi, 1999; Choi y Brown, 2003; Kalin et al., 2004; Rosen, 2004), la lesión o inactivación de la amígdala central y/o el BST anterior y posterolateral disminuye la expresión de miedo y de ansiedad contra diversos estímulos generadores de miedo. En no mamíferos hay muy pocos estudios funcionales comparables a estos trabajos. Sin embargo, se ha demostrado que la inmovilidad tónica (una quietud prolongada acompañada de falta de respuesta a estímulos, provocada por la constricción física), que constituye uno de los últimos recursos comportamentales defensivos relacionados con el miedo, se reduce mediante lesiones del antes llamado arquiestriado (ahora arcopallio) de aves (Maser et al., 1973), o del SAT (homólogo de la EA central) en lagartijas (Davies et al., 2002). La inmovilidad tónica es también parte del repertorio comportamental de algunos mamíferos, como los conejillos de indias y, tal vez, los humanos (Fusé et al., 2007), donde se ha relacionado con la catatonia (Moskowitz, 2004). En los conejillos de indias, la inmovilidad tónica parece controlada por la amígdala central y basolateral (Ramos et al., 1999; Leite-Panissi y Menescal-de-Oliveira, 2002).

Algunos de sus componentes, como la analgesia profunda asociada con la inmovilidad tónica (Leite-Panissi et al., 2001), dependen de la integridad de la amígdala central y de sus proyecciones al área gris periacueductal (Leite-Panissi et al., 2001; 2003).

El papel de las vías descendentes de la amígdala central en la expresión del miedo también se deduce de los resultados de experimentos de estimulación eléctrica. Uno de los comportamientos más comunes relacionados con el estrés, el malestar y la ansiedad, es la vocalización. Por ejemplo, las ratas presentan diversos tipos de vocalizaciones ultrasónicas y sónicas que informan de su estado emocional, algunas de las cuales están inducidas por estrés y ansiedad y están mediadas por proyecciones descendentes desde el área periacueductal a los núcleos motores de control vocal (Sanchez, 2003). A este respecto, los electrodos implantados en la amígdala y a lo largo de la trayectoria de la *stria terminalis* en monos desencadenan diferentes tipos de vocalizaciones (Jurgens, 1982), que incluyen voces de ronroneo y cotorreo (*'purring and chattering calls'*) que expresan una actitud de seguridad, desafiante y silbidos de alarma y gruñidos indicativos de la motivación por escapar y de resentimiento que acompañan al estrés social.



**Figura 34: La Amígdala como Sistema Funcional.** Según este esquema, los diferentes núcleos de la amígdala están interconectados de manera que conforman dos subsistemas funcionales llamados el 'subsistema central/basolateral' y el 'subsistema medial'. El subsistema central/basolateral coordina las reacciones innatas o aprendidas de miedo/ansiedad/aversión (a través de las proyecciones descendentes a la EA central) o de atracción/refuerzo (a través de sus proyecciones al estriado) a, prácticamente, cualquier estímulo. El subsistema medial está principalmente implicado en la coordinación de respuestas a estímulos quimiosensoriales (olfativos y vomerona-sales) que constituyen comportamientos emocionales específicos de especie, tales como los comportamientos reproductivos/agonísticos hacia con-específicos (respuestas a feromonas), comportamientos defensivos hacia con-específicos (como un componente de comportamientos

Al igual que en ratas, las vías anatómicas responsables de estas vocalizaciones en monos incluyen las regiones periacueductales que son el blanco de las proyecciones descendentes de la amígdala (Dujardin y Jurgens, 2005). Además, en los conejillos de indias la amígdala central está implicada en la expresión de vocalizaciones relacionadas con el dolor, ya que las vocalizaciones inducidas por estímulos nocivos pueden decrecer mediante la infusión intra-amigdalina de drogas colinérgicas y opioidérgicas (Leite-Panissi et al., 2004).

También se ha demostrado que la estimulación eléctrica de la amígdala central (Rosen y Davis, 1990; Koch y Ebert, 1993) aumenta la respuesta de sobresalto acústico, uno de los modelos de miedo condicionado mejor estudiados en ratas. De hecho, actualmente está bastante aceptado que el miedo condicionado a estímulos previamente neutros (estímulos condicionados) está mediado por un proceso de asociación Pavloviana entre los estímulos incondicionados (e.g. descarga eléctrica en las patas) y condicionado (un tono, una luz), que aparentemente tiene lugar en la amígdala basolateral gracias a la plasticidad sináptica mediada por NMDA (ver Davis, 1994; LeDoux, 2000; Lee et al., 2001; Rosen, 2004). A este respecto, se ha sugerido que la EA central está implicada en respuestas de miedo condicionadas, pero no incondicionadas (Choi y Brown, 2003; Rosen, 2004). Sin embargo, la EA central de mamíferos (más específicamente sus divisiones capsular y lateral) recibe *inputs* directos nociceptivos desde el área parabraquial y el tálamo intralaminar posterior (ver Gauriau y Bernard, 2002), que muy probablemente constituyen poderosos estímulos incondicionados capaces de desencadenar miedo. Estas aferencias de la EA central relacionadas con la nocicepción son ricas en el péptido CGRP (ver abajo). A este respecto, Borszcz (1993; 1995) demostró que para que un estímulo

doloroso (descarga en la cola) sea capaz de inducir miedo condicionado debe generar vocalizaciones (supuestamente incondicionadas). Es importante resaltar que las lesiones de la amígdala central suprimen la vocalización incondicionada suscitada por una descarga eléctrica en la cola (Borszcz y Leaton, 2003). Por lo tanto, la amígdala central (y muy probablemente toda la EA central) está implicada en la generación de respuestas de miedo/ansiedad o aversión a estímulos desencadenadores de miedo condicionados y, al menos, a algunos incondicionados, como el dolor.

La presencia de una densa inervación CGRPérgica en partes de la EA central de reptiles (Martínez-García et al., 2002b) y aves (Lanuza et al., 2000) sugieren que este es un papel general de la EA central de los amniotas. Una evidencia sólida en favor de este papel de la EA central son los experimentos de estimulación eléctrica de la amígdala en cocodrilos (Keating et al., 1970) e iguanas (Distel, 1978), en los que se desencadenan comportamientos relacionados con el miedo tales como la huida acompañada de vocalización, la dilatación de las pupilas y la hiperventilación. En aves, existen evidencias de que las proyecciones descendentes originadas en el antiguo arquiestriado median respuestas de escape (Phillips, 1964). Además, Phillips y Youngren (1986) demostraron que las lesiones del arquiestriado (ahora arcopalio) con ácido kaínico en pollitos neonatos reducían el miedo expresado mediante llamadas de angustia (píos). Más recientemente, se ha visto que el arcopalio juega un papel en la modulación de la ansiedad y de comportamientos relacionados con el miedo no aprendidos, tales como evitar el centro en un campo abierto (Lowndes y Davies, 1996). Probablemente estas respuestas estén mediadas por las proyecciones arcopaliales (Veenman et al., 1995; Davies et al., 1997; Dubbeldam et al., 1997; Kröner y Güntürkün, 1999) al llamado núcleo de la *stria terminalis* lateral (BSTl; Aste et al., 1998) y a la amígdala supalial (SpA). Estos grupos celulares son caudales al estriado medial (LPO/accumbens) y muestran proyecciones descendentes al hipotálamo (Berk, 1987), al área parabraquial (Wild et al., 1990) y al núcleo motor dorsal del nervio vago (Berk, 1987; Atoji et al., 2006), proyecciones que recuerdan a las de la amígdala central extendida de mamíferos. Otras similitudes neuroquímicas, como la presencia de células de proyección que contienen factores de liberación de corticotropina (Richard et al., 2004) y neurotensina (Atoji et al., 1996) dan mayor apoyo a la homología entre el BST lateral/SpA de aves y la amígdala central extendida de mamíferos.

En reptiles los datos son todavía más escasos. Sin embargo, las lesiones del homólogo en reptiles de la amígdala central extendida de mamíferos, el SAT, afectan a la expresión de comportamientos defensivos relacionados con el miedo tales como la inmovilidad tónica (Davies et al., 2002). Esto sugiere que el SAT y sus aferencias (desde la PDVR, el DLA y el dLC) tienen un papel en la expresión del miedo y de comportamientos relacionados con el miedo. De hecho, la estimulación eléctrica y las lesiones de la 'región amigdalina' (porción caudal de la DVR) del telencéfalo de los cocodrilos (Keating et al., 1970) provocan cambios en el comportamiento que sugieren un papel de esta región en la expresión de miedo.

Como conclusión, y a pesar de que son necesarios más estudios funcionales en no mamíferos para refinar esta idea, hay numerosas evidencias que sugieren que el circuito compuesto por las divisiones basolateral y central de la amígdala está implicado en la expresión de miedo y ansiedad no aprendida desencadenada por estímulos incondicionados (al menos dolor), y en la adquisición y la expresión de miedo y ansiedad condicionados.

#### ***6.2.1.2 Vía Amígdalo-Estriatal: La Amígdala y El Refuerzo***

En aparente contradicción con los datos revisados arriba, las lesiones en diferentes especies de mamíferos de la amígdala basolateral o de sus blancos en el estriado ventral (núcleo accumbens) afectan selectivamente al aprendizaje de respuestas instrumentales si estas son reforzadas con un cierto retraso. Esto da lugar a que los animales lesionados muestren un comportamiento impulsivo (Baxter y Murray, 2002; Cardinal et al., 2004). También hay evidencia de que las proyecciones desde la amígdala basolateral al estriado ventral (núcleo accumbens) están implicadas en asociaciones estímulo-refuerzo (Cador et al., 1989; Everitt et al., 1989; Parkinson et al., 2001). Esto ha llevado a que se incluya a la amígdala, y sus proyecciones al estriado, en el sistema del refuerzo del cerebro de los mamíferos, del que también forman parte el córtex prefrontal y los grupos celulares dopaminérgicos tegmentales (Baxter y Murray, 2002; Holland y Gallagher, 2004; Schultz, 2004). Así pues, la amígdala no sólo está implicada en la expresión de emociones negativas (miedo, ansiedad, aversión) y en los aprendizajes relacionados con éstas (miedo condicionado y ansiedad), sino que también está implicada en la expresión de emociones

positivas (refuerzo, atracción y comportamientos apetitivos; ver Kelley, 2004) y en los aprendizajes relacionados con éstas, como las asociaciones estímulo refuerzo.

En este contexto, las propuestas de homología entre la amígdala de mamíferos y aves sugieren que las vías al estriado desde el arcopallio, nidopallio caudal y las regiones adyacentes del telencéfalo de las aves deben estar implicadas en la generación de comportamientos apetitivos y asociaciones estímulo-respuesta. Esta hipótesis queda confirmada por los efectos de lesiones de los ganglios basales ventro-mediales (*lobus paraolfactorius*) en pollos recién nacidos. Los pollitos con estas lesiones muestran déficit en la adquisición de asociaciones estímulo-refuerzo (Izawa et al., 2002), así como comportamientos impulsivos (Izawa et al., 2003). Por su parte, la inactivación temporal del núcleo accumbens en palomos mediante infusiones de tetrodotoxina reducen globalmente el comportamiento instrumental (picotear) dirigido a obtener comida (Kalenscher et al., 2003). Por su parte, si se da a los palomos la oportunidad de picotear sobre dos teclas, una de ellas premiada de inmediato y otra tras un largo retraso, los palomos picotean preferentemente sobre la que es premiada a corto plazo. La inactivación del NCL elimina esta preferencia (Kalenscher et al., 2003). Estos datos sugieren que, como en mamíferos, las vías al estriado de las aves originadas en la amígdala basolateral están implicadas en la elaboración de respuestas apetitivas que requieren de asociaciones estímulo-refuerzo complejas, en las que la respuesta operante esta separada de la recompensa por un periodo de tiempo relativamente largo.

En conclusión, los datos disponibles en aves y mamíferos sugieren que el *output* de la amígdala al estriado ventral está implicado en la expectativa del refuerzo y en la generación de comportamientos dirigidos por esta expectativa de refuerzo. Esto implica reconocer los estímulos que predicen un refuerzo (asociaciones estímulo-refuerzo, refuerzos condicionados) y el establecimiento de respuestas instrumentales hacia estos predictores del refuerzo (asociaciones estímulo-respuesta). Aunque no hay datos comportamentales similares en otros vertebrados, la gran importancia y el gran valor adaptativo de estas formas de aprendizaje explican que este sistema se halle bien conservado en la evolución de los tetrápodos.

## 6.2.2 Los Papeles del Subsistema Medial

El segundo sistema de la amígdala de mamíferos está compuesto principalmente de centros vomeronasales secundarios, ya que incluye el córtex vomeronasal (COApm) y la EA medial, además de un núcleo palial profundo al córtex vomeronasal, el AHA. Sus patrones de conexiones con el hipotálamo y el sistema septo-hipocampal, así como la presencia de receptores para esteroides sexuales en la mayoría de centros de este circuito, sugiere que este sistema está implicado en el control de comportamientos reproductores y agonísticos desencadenados por señales químicas de conoespecíficos (olores y/o feromonas). Además, hay evidencias muy convincentes del papel de la amígdala medial de mamíferos en las reacciones defensivas contra algunos predadores. Las bases neurales de ambas funciones se discutirán a continuación.

### 6.2.2.1 *La Amígdala Vomeronasal y la Función Reproductiva*

La EA medial de los mamíferos, junto con el COApm y el AHA, sin duda, son activados por señales químicas procedentes de conoespecíficos del mismo sexo o del sexo contrario, que son detectadas por el órgano vomeronasal. Algunos estudios llevados a cabo en roedores revelan que estas feromonas desencadenan cambios neuroendocrinos en conoespecíficos (e.g. los efectos Whitten, Vanderbergh, Bruce y Lee-Boot: ver Halpern, 1987). Además, las feromonas detectadas por el órgano vomeronasal desencadenan respuestas comportamentales que incluyen respuestas agonísticas/territoriales (agresión entre machos, contramarcaje territorial) o de atracción, y de facilitación del cortejo, así como la conducta sexual, que incluye el comportamiento paracopulatorio (e.g. vocalizaciones) y la monta/lordosis (Halpern y Martínez-Marcos, 2003).

### 6.2.2.2 *La Amígdala Extendida Medial y las respuestas neuroendocrinas*

En mamíferos, tanto los estímulos vomeronasales como la cópula pueden desencadenar respuestas neuroendocrinas. Así, en muchas especies de mamíferos la exposición de las hembras a las feromonas de macho induce un aumento brusco de la hormona luteinizante mediado por el órgano vomeronasal (Beltramino y Taleisnik, 1983) que estimula la ovulación. En otras especies, como los hurones, la ovulación no es espontánea, sino que es inducida por medio de la cópula (Carroll et al., 1985). En machos se encuentra un efecto similar en respuesta a las feromonas de hembra (Coquelin et al., 1984; Fernández-Fewell y Meredith, 1998), que se acompaña de una activación de c-

fos en las células preópticas mediales (Fewell y Meredith, 2002). Además, la estimulación eléctrica del órgano vomeronasal de machos de hámster (probablemente implicado en la detección de feromonas; Halem et al., 1999) activa una población de las células del área preóptica que expresan el factor de liberación de la hormona luteinizante (Meredith y Fewell, 2001). Estos datos sugieren que las respuestas neuroendocrinas a feromonas (Bronson y Whitten, 1968) son mediadas por interacciones de la EA medial con las células que expresan el factor de liberación de la hormona gonadotropina de la región preóptica medial rostral (ver Swanson, 1987). Una vía similar explicaría la aceleración o el retraso de la pubertad en hembras pre-púberes por señales químicas de conespecíficos.

No obstante, la EA medial también puede estar implicada en los efectos neuroendocrinos del apareamiento (ovulación inducida por la cópula en hembras; Bakker et al., 2001). De hecho, en los mamíferos estudiados, la cópula activa la expresión de *c-fos* no sólo en las células preópticas que expresan el factor de liberación de la hormona luteinizante (Fernández-Fewell y Meredith, 1994; Wersinger y Baum, 1996; Pfau y Heeb, 1997; Bakker et al., 2001; Meredith y Fewell, 2001), sino también en la EA medial. A este respecto, se ha demostrado que los *inputs* vasopresinérgicos a las células que expresan el factor de liberación de la gonadotropina, la mayor parte de los cuales deben originarse en la EA medial (ver arriba), son importantes para la modulación de los picos de hormona luteinizante (Dobson et al., 2003). No obstante, al menos algunas respuestas neuroendocrinas requieren, de la activación de otras proyecciones de la EA medial al hipotálamo, además de la que acaba en el área preóptica. Así, se ha demostrado que las lesiones del núcleo premamilar ventral bloquean la ovulación inducida por feromonas (Beltramino y Taleisnik, 1985).

### ***6.2.2.3 La Amígdala Extendida Medial y el comportamiento socio-sexual***

Tal y como se ha apuntado anteriormente, la EA medial está interconectada con una serie de centros prosencefálicos que están implicados en el comportamiento reproductor. Entre estos centros encontramos varios núcleos del hipotálamo medial, como el núcleo preóptico medial (MPO), el núcleo tuberal, la porción ventro-lateral del núcleo ventromedial (VMH) y el núcleo premamilar ventral (ver Canteras, 2002). En el telencéfalo, el resto de núcleos amigdalinos vomeronasales (COApm y AHA) y partes del sistema septo-hipocampal (incluida la porción ventral del septum lateral), también se

consideran parte de este circuito. Los principales *outputs* de este circuito son el MPO y el VMH, que están implicados en el control del comportamiento sexual de machos (Hull et al., 2002) y hembras (Blaustein y Erskine, 2002) respectivamente. De acuerdo con esto, la mayoría de los núcleos que forman este circuito son sexualmente dimórficos y expresan receptores a esteroides sexuales que, muy probablemente, median los efectos moduladores de las hormonas esteroideas en la cópula, la agresión territorial y otras formas de comportamiento reproductivo y agonístico. Así, la EA medial, el COApm y el AHA están en una buena posición para facilitar respuestas comportamentales agonísticas o reproductivas innatas (Kollack-Walker y Newman, 1995) a feromonas y a otras señales químicas procedentes de conespecíficos.

Los estudios funcionales de los homólogos de la amígdala medial y/o el AHA de vertebrados no mamíferos se restringen a aves. Según éstos, la lesión del TnA de codornices macho (Thompson et al., 1998) altera los comportamientos copulatorios y paracopulatorios (incluidas las vocalizaciones de cortejo), reforzando la idea de que este núcleo es homólogo de partes de la amígdala medial de mamíferos. Cheng et al., (1999) realizaron lesiones similares en otras especies de aves, tales como las tórtolas y los estorninos. Las lesiones en hembras de tórtola provocan cambios en comportamientos sociales tales como un incremento en el arrullo que los autores interpretan como una indiferencia a los ataques de machos y como un distanciamiento social. Los datos en estorninos también sugieren que las lesiones del TnA provocan una falta de inhibiciones sociales.

Las conexiones desde la EA medial al septum lateral parecen fundamentales para la modulación de comportamientos sociales no reproductores. Estos denominados comportamientos agonísticos, incluyen los que median los encuentros entre conespecíficos del mismo sexo que compiten por el territorio (comportamientos territoriales y de anuncio de su propia presencia) y, en última instancia, por los recursos y posibles parejas. Usando diferentes especies de aves, Goodson y colaboradores (Goodson, 1998a; 1998b; 2004; Goodson y Adkins-Regan, 1999) han demostrado que la inervación vasotocinérgica (y por péptido intestinal vasoactivo) del septum lateral, que presumiblemente se origina en la EA medial (ver arriba), modula la agresividad en la competencia por la pareja y el canto territorial (de defensa del territorio) pero no el cortejo. También se ha observado un papel de la vasotocina en la modulación de

comportamientos agonísticos en mamíferos, anfibios y peces, lo que sugiere que este circuito tiene una larga historia evolutiva con un papel muy bien conservado (Goodson y Bass, 2001).

#### ***6.2.2.4 La Amígdala Vomeronasal: Comportamiento Defensivo y Miedo Desencadenado por el Depredador***

Además de un papel en la comunicación intraespecífica, la amígdala medial de mamíferos parece mediar el miedo innato a señales químicas derivadas de depredadores comunes (ver Dielenberg y McGregor, 2001). Así, se ha comprobado que la confrontación de una rata a un collar que ha sido usado por un gato, o a señales químicas derivadas de heces de zorro (2,5-dihidro-2,4,5-trimetiltiazolina, TMT) provoca de manera innata cambios endocrinos (aumentos en los niveles de corticosterona y de hormona adrenocorticotropa), vegetativos (aumento presión arterial) y comportamentales (parálisis, *freezing*, y, cuando es posible huída o escondite; ver Rosen, 2004). Esta respuesta es innata, puesto que se da en ratas criadas en cautividad sin experiencia alguna con estos predadores.

Aunque el órgano vomeronasal se considera implicado, fundamentalmente, en la detección de feromonas (por definición, secretadas por conespecíficos), hay evidencias experimentales que sugieren que estas respuestas a señales químicas de depredadores son mediadas por el órgano vomeronasal. Así, las ratas no muestran miedo (medido como tiempo de escondite) cuando se les presenta un collar usado por un gato si una rejilla les impide el contacto directo con él (Dielenberg y McGregor, 1999). Esto indica que la sustancia derivada de gatos que desencadena miedo no es volátil, tal y como se ha visto para algunas feromonas de conespecíficos detectadas por el órgano vomeronasal; (Moncho-Bogani et al., 2002; 2005; Luo et al., 2003). De acuerdo con esto, las señales químicas derivadas de gatos inducen c-fos (Dielenberg y McGregor, 2001) en la EA medial, incluidos el MeP y partes del BST. Además, éstas señales químicas también activan otros centros el circuito defensivo del prosencéfalo (ver Canteras, 2002) tales como el septum lateral ventral, el hipotálamo anterior, la porción dorso-medial del VMH y el núcleo premamilar dorsal. Sorprendentemente, a pesar de que las ratas muestran claros signos de miedo cuando se enfrentan a señales químicas derivadas de gatos (Dielenberg y McGregor, 2001), ni su amígdala central ni la amígdala basolateral parecen

ser activadas por estos estímulos. Esto ha llevado a los autores a sugerir que la amígdala medial es la responsable del miedo incondicionado, mientras que la amígdala central/basolateral está sólo implicada en la expresión del miedo condicionado (tal y como se ha discutido arriba, ver Rosen, 2004). Esto se confirma parcialmente por los efectos de las lesiones de la amígdala medial o central en ratas sobre el miedo desencadenado por los olores de gato (Li et al., 2004). Los resultados indican que, en ratas, la amígdala medial pero no la central está implicada en la generación del miedo a derivados químicos de gatos. También hay evidencia de que la amígdala medial puede participar en el miedo y el estrés inducido por otros estímulos (como la inmovilidad forzada de manera aguda o la descarga eléctrica en las patas; Pezzone et al., 1992; Rosen et al., 1998; Dayas et al., 1999; Kubo et al., 2004) aunque estos resultados muestran gran variabilidad entre cepas de rata (Ma y Morilak, 2004). El circuito implicado se desconoce.

La expresión de *c-fos* inducida por la TMT ha sido estudiada recientemente (Day et al., 2004) y el patrón de la actividad cerebral difiere del generado por las señales químicas derivadas de gatos. Así, aunque en ambos casos el circuito defensivo del prosencéfalo se activa, la TMT sólo activa la MeA, pero no la MeP. Además, la TMT desencadena una fuerte activación de la amígdala central. Estas diferencias pueden deberse al órgano sensorial utilizado para detectar la TMT y las señales químicas relacionadas con gatos que desencadenan miedo. Mientras que las señales químicas derivadas de gatos parecen estímulos detectados por el órgano vomeronasal (Dielenberg y McGregor, 2001), la TMT es una señal química volátil que muestra un olor intenso y característico al olfato humano, siendo muy probable que sea detectado por el sistema olfativo principal. De acuerdo con esto, la TMT activa el bulbo olfativo principal y aquellas porciones de la amígdala medial que muestran *inputs* directos desde el bulbo olfativo principal, como la MeA (ver arriba, Day et al., 2004). El hecho de que la MeA proyecte a la amígdala central, puede constituir un circuito para el miedo incondicionado inducido por olores que incluye al bulbo olfativo principal, sus proyecciones directas (y tal vez las indirectas) a la MeA y sus proyecciones a la Ce (Myers y Rinaman, 2005).

Por todo esto, la amígdala medial de mamíferos no sólo parece implicada en coordinar comportamientos socio-sexuales en respuesta a feromonas de conoespecíficos, sino que también está implicada en reacciones de miedo/defensivas a olores y a sustancias detectadas por el órgano vomeronasal secretadas por depredadores comunes. En otras

palabras, la amígdala medial parece el centro clave para orquestar respuestas innatas a señales químicas biológicamente significativas (feromonas y olores) derivadas de conoespecíficos (individuos de la misma especie) y aloespecíficos (individuos de otras especies). Se han llevado a cabo estudios funcionales similares en reptiles que sugieren que éstos también pueden utilizar estímulos químicos para detectar a los depredadores y para generar reacciones de defensa anticipatorias. De hecho, muchas serpientes de la subfamilia *Crotalidae* muestran reacciones defensivas a uno de sus depredadores, la serpiente reina (*Lampropeltis getula*) que están mediadas por el órgano vomeronasal (Miller y Gutzke, 1999). No hay disponibles estudios funcionales similares en aves, pero ya que los estímulos señal para la detección de depredadores no son de naturaleza química sino visual o auditiva, es posible que los estímulos visuales y auditivos de los predadores alcancen la amígdala medial extendida y a través de la misma activen los circuitos cerebrales del miedo y los comportamientos defensivos.

### **6.3 LA AMÍGDALA COMO SISTEMA FUNCIONAL (FIGS. 33 y 34)**

Swanson y Petrovich (1998), en su revisión de la estructura y la función de la amígdala, propusieron que el término amígdala debía abandonarse ya que no es ni una unidad estructural ni una unidad funcional. Desde un punto de vista funcional, consideraron que la amígdala incluía porciones de diferentes sistemas cerebrales, como el autonómico (amígdala central), el quimiosensorial (amígdala cortical, amígdala medial, AHA, AB y Bp) y el fronto-temporal (el resto de la amígdala basolateral, L y Ba) (Fig. 33).

Sin embargo, la revisión de los datos disponibles en diferentes vertebrados revela que la amígdala está compuesta por dos subsistemas funcionales que, conjuntamente, controlan diversos aspectos del comportamiento y la fisiología (Fig. 34). El subsistema que tiene su *output* a través de la EA central también incluye porciones de la amígdala basolateral que Swanson y Petrovich (1998) consideran como parte de la amígdala ‘olfativa’ (ABa, ABp, Bp) y un núcleo ‘fronto-temporal’ (L). Por ello, el ‘subsistema central/basolateral’ de la amígdala de amniotas abarca estructuras que pertenecen a las tres divisiones funcionales de la amígdala propuestas por Swanson y Petrovich (1998) sugiriendo que una gran parte de la amígdala actúa como un sistema funcional. El ‘subsistema medial’ de la amígdala está compuesto exclusivamente por núcleos

pertenecientes al ‘compartimento olfativo’ de la amígdala de Swanson y Petrovich. Sin embargo, hay evidencias de que la amígdala medial está implicada en la generación de respuestas de estrés autonómicas y/o endocrinas (Dayas et al., 1999; Kubo et al., 2004), por lo que se le puede considerar igualmente como parte de la ‘amígdala autonómica’ junto con la amígdala central.

Los subsistemas central/basolateral y medial de la amígdala tal y como se proponen aquí, también están interconectados y conectados con centros prosencefálicos similares a través los cuales pueden dirigir, conjuntamente, comportamientos relevantes. Así, como hemos discutido arriba, la MeA no sólo recibe *inputs* vomeronasales, sino que también recibe *inputs* olfativos, y proyecta a partes de la EA central. Esta conexión proporciona un *input* vomeronasal y/o olfativo a la EA central que podría mediar las reacciones de miedo/ansiedad a este tipo de estímulos (Day et al., 2004; Myers y Rinaman, 2005). Esto no descarta la posibilidad de que partes de la EA medial medien algunas reacciones de miedo/ansiedad, tanto a estímulos quimiosensoriales (Dielenberg y McGregor, 2001; Li et al., 2004) como a estresores no quimiosensoriales (Dayas et al., 1999; Kubo et al., 2004), sin la implicación de la EA central.

Además del papel descrito en la mediación de comportamientos reproductivos, agonísticos y defensivos en respuesta a señales quimiosensoriales, el subsistema medial de la amígdala está, sin duda, implicado en los comportamientos apetitivos debidos al valor reforzante de las feromonas sexuales (Moncho-Bogani et al., 2002; 2005). Como ya hemos apuntado en el capítulo 5, el valor reforzante de estas feromonas es probable que esté mediado por proyecciones directas desde el subsistema medial de la amígdala al estriado ventral o por conexiones indirectas desde el subsistema medial de la amígdala al estriado ventral a través del subsistema central/basolateral (Moncho-Bogani et al., 2005, capítulo 5). Por lo tanto, estos comportamientos son dependientes de las interconexiones entre los dos subsistemas amigdalinos.

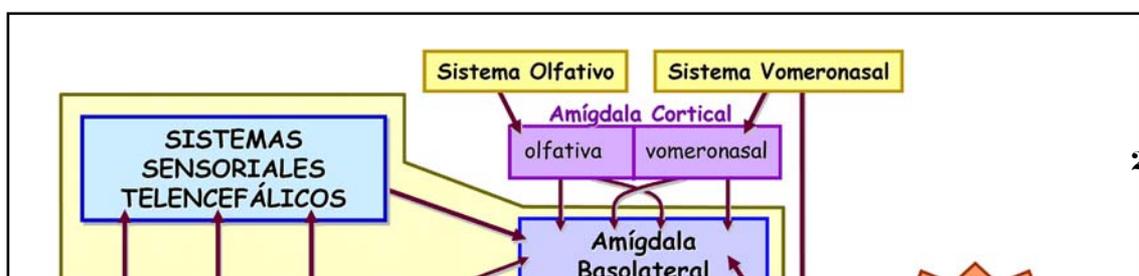
Finalmente, partes del subsistema central/basolateral de la amígdala, como el AB posterior, originan importantes proyecciones al sistema defensivo del hipotálamo (e.g. el hipotálamo anterior y el VMH dorso-medial). Canteras (2002) interpreta esta vía como mediadora de reacciones defensivas a estímulos no quimiosensoriales, tales como los estímulos visuales, somatosensoriales y auditivos.

Como conclusión, la división funcional propuesta por Swanson y Petrovich (1998) no parece defendible sobre la base de las evidencias revisadas. Por el contrario, la amígdala está compuesta por dos subsistemas funcionales, nombrados aquí como los subsistemas central/basolateral y medial, que, junto con otros centros prosencefálicos, gobiernan respuestas comportamentales emocionales a diferentes tipos de estímulos. Este tipo de respuestas incluye comportamientos apetitivos (dirigidos a la obtención de un refuerzo) que implican aprendizaje (*output* al estriado), respuestas de miedo/ansiedad/aversión (amígdala central extendida) y comportamientos reproductivos/agonísticos y defensivos. Las interacciones entre ambos subsistemas son necesarias para realizar estas funciones.

## 6.4 EVOLUCIÓN DEL CEREBRO EMOCIONAL: LA AMÍGDALA Y LA EVALUACIÓN DE ESTÍMULOS

Los comportamientos emocionales pueden expresarse en respuesta a estímulos intrínsecamente atractivos y reforzantes (como las feromonas sexuales, sabores dulces y salados) o en respuesta a estímulos intrínsecamente aversivos/desencadenantes de miedo (como el dolor o sensaciones viscerales desagradables, señales químicas procedentes de depredadores, sonidos fuertes o voces de alarma; Fig. 34 y Fig. 35).

La presencia de algunos *inputs* sensoriales directos a la amígdala extendida y al telencéfalo estriado-palidal permite dar respuestas rápidas y automáticas a estos estímulos. Así, los estímulos nociceptivos alcanzan directamente partes de la EA central a través de las proyecciones ricas en CGRP desde el área parabraquial y el tálamo intralaminar (Gauriau y Bernard, 2002). Esta vía parece mediar reacciones de miedo incondicionadas (Borszcz y Leaton, 2003). Además, las reacciones de miedo/defensivas a los estímulos químicos relacionados con depredadores parecen estar mediadas por los *inputs* vomeronasales/olfativos a la amígdala medial (Li et al., 2004). Por otra parte, el acceso directo de estímulos reforzantes al estriado ventral media la mayoría de los comportamientos apetitivos a refuerzos naturales, tales como el consumo de la comida y el agua, la preferencia por determinados sabores (al menos el dulce) y el comportamiento sexual (Pecina et al., 2003; Kelley, 2004).



Como hemos visto, la amígdala basolateral de los vertebrados amniotas recibe aferencias convergentes desde todos los sistemas sensoriales, pero es evidente que no todos los estímulos que alcanzan la amígdala desencadenan miedo o refuerzo. Sin embargo, cuando un estímulo neutro coincide con un estímulo atractivo o aversivo, se produce un aprendizaje asociativo Pavloviano en el que el estímulo atractivo o aversivo actúa como estímulo incondicionado (EI), y el estímulo previamente neutro origina una respuesta condicionada similar a la provocada por el EI. En otras palabras, los animales adquieren miedo o atracción a estímulos previamente neutros que, de este modo, quedan etiquetados emocionalmente. La plasticidad sináptica en la amígdala basolateral debe mediar este tipo de condicionamiento Pavloviano, y las proyecciones palio-subpaliales dentro del circuito amigdalino deben mediar la respuesta condicionada. Nuestro estudio

indica que el circuito responsable del comportamiento emocional y el aprendizaje emocional está presente en todos los amniotas estudiados y constituye uno de los atributos que caracterizan al prosencéfalo del amniota ancestral.

Aunque la mayoría de los modelos de condicionamiento emocional usan estímulos somatosensoriales o gustativos como EI y estímulos auditivos o visuales como estímulos condicionados, los estímulos vomeronasales pueden jugar un importante papel como estímulos incondicionados. Así, como ya hemos discutido, las señales químicas detectadas por el órgano vomeronasal parecen desencadenar reacciones innatas de miedo/defensivas (comportamiento defensivo de la rata a un collar usado por un gato; ver Dielenberg y McGregor, 1999). Los estudios en diversos roedores revelan que la atracción innata a posibles parejas (Moncho-Bogani et al., 2002; 2005), así como diferentes aspectos de comportamientos copulatorios (Beauchamp et al., 1982; 1985; Del Punta et al., 2002; Leypold et al., 2002; Stowers et al., 2002) y paracopulatorios (vocalizaciones ultrasónicas; Wysocki et al., 1982) hacia congéneres del otro sexo están mediados por feromonas no volátiles aparentemente detectadas por el órgano vomeronasal. Además, estímulos similares parecen desencadenar comportamientos agonísticos en congéneres del mismo sexo, actuando como el contra-marcaje competitivo (Hurst y Beynon, 2004) o la agresión entre machos (Clancy et al., 1984; Stowers et al., 2002; Del Punta et al., 2002; Leypold et al., 2002).

En relación con esto, las asociaciones Pavlovianas entre estímulos olfativos (condicionados) y vomeronasales (EI) pueden jugar un papel muy relevante. Este tipo de asociaciones otorga un valor predictivo a los olores que pueden ser detectados a distancia, dado que son sustancias volátiles. Esto permite al animal anticipar sus reacciones a feromonas o a señales de depredadores detectadas por el órgano vomeronasal (que normalmente no son volátiles; Wysocki et al., 1980; Dielenberg y McGregor, 1999; Moncho-Bogani et al., 2002; 2005; Luo et al., 2003), siendo capaz de seguir la pista de la fuente de feromonas atractivas, o de evitar o escaparse de los estímulos vomeronasales repulsivos o que desencadenan miedo (de predadores, por ejemplo), lo que tiene un enorme valor adaptativo y otorga ventajas al animal que muestra esta habilidad.

Los datos anatómicos sugieren la existencia de una convergencia olfativa-vomeronasal significativa en la amígdala basolateral de anfibios, reptiles y mamíferos (ver

arriba), que permitiría la asociación Pavloviana de estímulos olfativos y vomeronasales, convirtiendo a los olores en estímulos atractivos o aversivos condicionados. De hecho, la amígdala basolateral contiene neuronas que responden a un olor determinado dependiendo de si ha sido previamente asociado a un sabor agradable o desagradable (Schoenbaum et al., 1999). Un mecanismo similar debe mediar las asociaciones olfato-vomeronasales.

Por todo esto, las proyecciones desde la amígdala basolateral al continuo amígdala extendida-accumbens pueden ser concebidas como el sustrato neural para la adquisición de respuestas emocionales básicas con gran valor adaptativo (Davis, 1994; Ledoux, 2000), positivas (atracción) o negativas (aversión/miedo), hacia todo tipo de estímulos. Además, también se podría producir una convergencia de información olfativa y vomeronasal en el Tu medial y las estructuras adyacentes (CB y ICj) dado que estas estructuras reciben proyecciones convergentes desde núcleos paliales amigdalinos olfativos (COApl) y vomeronasales (COApm y AHA).

Según nuestro punto de vista, la amígdala palial en la que se genera este tipo de aprendizaje asociativo, estaría ya presente en los primeros vertebrados terrestres. De hecho, incluso en anfibios, la amígdala medial (que recibe el grueso de proyecciones desde el bulbo olfativo accesorio) y la amígdala lateral (que recibe un importante *input* desde el bulbo olfativo principal) están interconectadas (Moreno y González, 2003; 2004). Además, en anfibios las aferencias talámicas directas a la amígdala aunque escasas, existen, probablemente porque aparecieron muy temprano en la historia evolutiva de los vertebrados. Estas vías, deben otorgar información sobre estímulos simples, pero innatamente significativos (e.g. dolor, sensaciones viscerales, ruidos fuertes súbitos o ráfagas de luz) que contribuirían al etiquetaje emocional de los olores. De este modo, parece que la colonización del medio terrestre por los primeros amniotas debió su éxito, al menos en parte, a la capacidad de etiquetar emocionalmente los compuestos volátiles detectados por el sistema olfativo mediante su asociación con estímulos quimiosensoriales atractivos o aversivos (principalmente vomeronasales) y con estímulos no quimiosensoriales.

Por tanto, todos los datos anatómicos, neuroquímicos y funcionales discutidos en esta tesis sugieren que el telencéfalo del amniota ancestral poseía un sistema amígdalo-estriatal, que constituyó el primordio de su cerebro emocional.

## **6.5 LA AMÍGDALA Y LA EVOLUCIÓN DEL PALIO EN VERTEBRADOS**

Como ya hemos visto a lo largo de la tesis, existen diversos estudios comparados (Bruce y Neary, 1995; Lanuza et al., 1997; Lanuza et al., 1998; este trabajo) que indican que los reptiles poseen una amígdala palial bien desarrollada en la cual se pueden encontrar núcleos corticales (superficiales, laminados y quimiosensoriales) y núcleos profundos. Existen datos anatómicos y neuroquímicos en diferentes reptiles y aves que sugieren con fuerza que la amígdala palial ya estaba presente en el amniota ancestral y que por tanto ha experimentado una evolución muy conservadora (Martínez-García et al., 2002; 2007a).

En todos los amniotas estudiados, la amígdala palial recibe aferencias importantes desde las áreas paliales sensoriales del telencéfalo. Las regiones unimodales especializadas del tálamo dorsal proporcionan estímulos no quimiosensoriales a áreas específicas del palio, donde estos estímulos se procesan por medio de complejos circuitos que incluyen proyecciones excitadoras palio-paliales e interneuronas locales que median procesos inhibitorios de retroalimentación negativa (*feed-back*) y positiva (*feed-forward*) y la modulación de centros superiores. Por contra, los anfibios no poseen vías sensoriales unimodales tálamo-corticales (Martínez-García, 2003), sino que sus núcleos sensoriales del tálamo dorsal proyectan al estriado (ver Endepols et al., 2004).

Por lo tanto, las áreas corticales sensoriales aparecieron por primera vez en amniotas. En reptiles, estas áreas están representadas por la DVR anterior, en aves por la DVR anterior (entopalio, núcleo basorostral del palio, campo L del nidopalio), por el Wulst visual y somatomotor del hiperpalio y en mamíferos por el isocórtex sensorial (Fig. 35). La aparición de estas áreas sensoriales corticales en amniotas vino acompañada de una diferenciación, dentro de la amígdala palial, de áreas corticales superficiales que reciben *inputs* olfativos directos, y de territorios nucleares profundos que presentan conexiones con el córtex sensorial no olfativo. Así, a nivel del prosencéfalo, la aparición

de los primeros amniotas se caracterizó por dos novedades: la aparición de un palio dedicado al procesamiento sensorial unimodal, y la de una auténtica amígdala basolateral que era receptora de la información sensorial tras su procesamiento palial.

El procesamiento de la información del entorno antes de su llegada a la amígdala basolateral supuso una gran ventaja adaptativa ya que permite a los animales reaccionar de manera distinta a los estímulos con una configuración similar pero con un valor emocional diferente. Por poner un ejemplo ilustrador, una lombriz gruesa puede constituir una fuente de alimento a perseguir por un insectívoro voraz, mientras que una pequeña serpiente puede ser una amenaza que se debe evitar. Discriminar los estímulos derivados de ambos animales y aprender a reaccionar adecuadamente con prontitud requiere de una elevada capacidad de procesamiento visual seguida de una evaluación emocional inmediata y una respuesta comportamental asociada. La ventaja de esta capacidad hizo que la misma, fuera seleccionada y mejorada en las distintas líneas evolutivas derivadas de los amniotas ancestrales. Esto dio lugar a un aumento en el tamaño y la complejidad del telencéfalo sensorial en todas las líneas evolutivas de amniotas, fenómeno que parece haber ocurrido de manera independiente en cada línea.

En los reptiles terápsidos, que dieron lugar a los mamíferos actuales, el procesamiento sensorial tuvo lugar principalmente en el palio dorsal, que evolucionó en un isocórtex sofisticado con áreas sensoriales primarias y regiones asociativas complejas que proporcionan una información altamente procesada a la amígdala. Por el contrario, en los primeros saurópsidos, la amígdala basolateral incipiente recibió aferencias convergentes desde el telencéfalo sensorial ventro y lateropalial, tal y como ocurre en los reptiles (PDVR, Lanuza et al., 1998) y en las aves modernos (nidopalio caudolateral, Metzger et al., 1998; Kröner y Güntürkün, 1999). La amígdala basolateral ancestral también mostraría aferencias directas desde núcleos multimodales del tálamo posterior, como ocurre en reptiles (aferencias desde el tálamo medial posteromedial (Lanuza et al., 1998) y en aves (aferencias talámicas desde el tálamo dorsolateral posterior y la región periovoidal; Gamlin y Cohen, 1986; Wild, 1987; Durand et al., 1992). Muy probablemente, en el amniota ancestral, esta aferencia talámica ya tendría un componente rico en CGRP, tal y como ocurre en aves (Lanuza et al., 2000) y en reptiles (Martínez-García et al., 2002b).

Este patrón de conexiones de la amígdala basolateral, con aferencias sensoriales multimodales redundantes y con eferencias a regiones subpaliales que median respuestas emocionales básicas, constituye el sustrato neuroanatómico para el etiquetado emocional de los estímulos recibidos mediante su asociación con los previamente atractivos-reforzantes o aversivos (que suscitan miedo o respuestas de evitación). Este circuito constituiría la maquinaria neural básica para la expresión y el aprendizaje emocional, el cerebro emocional, que estaría ya probablemente presente en el telencéfalo del amniota ancestral.

Estos descubrimientos, junto con otras numerosas evidencias anatómicas y neuroquímicas, apoyan la necesidad de descartar la hipótesis del ‘cerebro triuno’ de mamíferos propuesta por MacLean (1990). Según esta hipótesis, el mamífero posee un ‘cerebro reptiliano’ fundamentalmente compuesto de un núcleo estriatal sobre el cual crecieron sucesivamente capas límbicas, dando lugar al cerebro paleomamífero, y neocorticales (cerebro neomamífero). En contra de esta hipótesis, los dos primeros componentes considerados por MacLean en su propuesta sobre la secuencia evolutiva de la filogenia del cerebro de mamíferos ya estaban presentes en los primeros amniotas.

# Capítulo 7

## CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

- 1) Tanto en reptiles como en mamíferos, la amígdala incluye derivados del palio lateral entre los que se distinguen regiones superficiales corticales (laminares) y núcleos profundos. En los reptiles, el córtex amigdalino lateropalial está formado por la mayor parte del córtex lateral caudal, mientras que en mamíferos está constituido por el núcleo posterolateral cortical y por las áreas de transición con el córtex piriforme. Por otro lado, la amígdala lateropalial profunda la componen el núcleo dorsolateral amigdalino en reptiles y el núcleo basal y el área de transición amígdalo-piriforme en mamíferos.
- 2) Las regiones amigdalinas del palio lateral cortical de reptiles y mamíferos presentan proyecciones moderadas al núcleo accumbens y densas al tubérculo olfativo e islotes de Calleja y proyecciones escasas al estriado dorsal.
- 3) Las porciones profundas del palio lateral presentan, tanto en reptiles como en mamíferos, proyecciones bilaterales y masivas tanto al estriado ventral (incluyendo el tubérculo olfativo) como al estriado dorsal.
- 4) La amígdala también incluye derivados del palio ventral, entre los que también se distinguen regiones superficiales corticales y núcleos profundos. En reptiles el palio ventral superficial está compuesto por el núcleo del tracto olfativo lateral, la amígdala ventral anterior y el núcleo esférico. En mamíferos, la amígdala superficial ventropalial la conforman el núcleo del tracto olfativo lateral, y los núcleos corticales anterior y posteromedial. Por su parte, la amígdala ventropalial profunda incluye partes de la cresta dorsal ventricular posterior, la amígdala lateral y el área ventral posterior de los reptiles, y los núcleos lateral y basal accesorio y la transición amígdalo-hipocámpica de los mamíferos.
- 5) Tanto en reptiles como en mamíferos, las principales proyecciones estriatales de la amígdala cortical ventropalial se originan en el córtex vomeronasal, representado por el núcleo esférico en los reptiles y el núcleo posteromedial cortical de los mamíferos. En ambos casos, las proyecciones definen una porción del estriado ventral conocida como olfatoestriado en los reptiles, y que en los mamíferos está constituido por las porciones mediales del tubérculo olfativo y los islotes de Calleja y puentes celulares estriatales adyacentes.

- 6) La amígdala ventropalial profunda presenta un patrón complejo de proyecciones al estriado. La porción dominada por estímulos vomeronasales (área amígdalo-hipocámpica en mamíferos, amígdala ventral posterior de reptiles) muestra proyecciones al estriado similares al córtex vomeronasal. Por el contrario, la amígdala lateral de mamíferos y las porciones de la PDVR de reptiles homólogas a la misma, presentan proyecciones restringidas a una región central del estriado ventral (el área central del núcleo accumbens en mamíferos) y al estriado dorsal adyacente. Por último, la amígdala basal accesoria de los mamíferos y su homólogo en los reptiles (amígdala lateral y partes de la PDVR) presentan proyecciones amplias al estriado ventral y a parte del estriado dorsal.
- 7) Este esquema puede ser aplicable de forma consistente al telencéfalo de las aves, permitiéndonos entender la organización de la amígdala palial aviar a pesar de la desaparición del sistema vomeronasal y la reducción del olfativo. Esta estrategia sugiere de forma convincente que la amígdala de las aves incluye no sólo las estructuras nombradas como amígdalinas en la nueva nomenclatura (núcleo posterior de la amígdala palial, amígdala subpalial y núcleo *taeniae* de la amígdala) sino, además, todo el arcopalio con sus porciones latero y ventropaliales, parte del nidopalio caudal y estructuras lateropaliales adyacentes como el área temporo-parieto-occipital.
- 8) Los datos histoquímicos en reptiles, mamíferos y aves sobre la distribución de dopamina, del péptido relacionado con el gen de la calcitonina, de la vasopresina y del factor de liberación de la hormona corticotropa, avalan cabalmente esta hipótesis de homologías. Además, los datos disponibles sobre las conexiones no estriatales de la amígdala de mamíferos, aves y reptiles también concuerdan con nuestra propuesta de homologías.
- 9) Considerados globalmente, todos estos datos indican que la amígdala ha evolucionado de forma muy conservadora en la filogenia de los amniotas y que las conexiones con el estriado se han mantenido sin apenas cambios en los distintos grupos de amniotas.
- 10) Por todo ello, conviene abandonar la popular idea del ‘cerebro triuno’ propuesta por Paul MacLean para entender el origen evolutivo del cerebro humano y de sus

capacidades. El núcleo ancestral del telencéfalo que heredamos de los primeros tetrápodos debía incluir, en todo caso, un cerebro emocional del que la amígdala y sus proyecciones sobre el estriado constituyen elementos fundamentales.

- 11) A pesar de su evolución conservadora, el cerebro emocional ha sufrido cambios en la línea de los mamíferos, entre los que destaca la aparición de una porción del córtex frontal (isocórtex) con el circuito amígdalo-estriatal.



# **Capítulo 8**

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Aggleton JP (ed). 2000. The Amygdala. A Functional Analysis, segunda edición. Oxford: Oxford University Press.
- Alheid GF, de Olmos JS, Beltramino CA. 1995. Amygdala and extended amygdala. En: editor Paxinos G. The Rat Nervous System. San Diego: Academic Press. p 495-578.
- Alheid GF, Shammah-Lagnado SJ, Beltramino CA. 1999. The interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure: a novel layer of the central division of extended amygdala. *Ann N Y Acad Sci.* 877:645-654.
- Amorapanth P, LeDoux JE, Nader K. 2000. Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus. *Nat Neurosci.* 3:74-79.
- Andreu MJ, Davila JC, de la Calle A, Guirado S. 1994. Monoaminergic innervation patterns in the anterior dorsal ventricular ridge of a lacertid lizard, *Psammodromus algirus*. *Brain Behav. Evol.* 44:175-186.
- Andreu MJ, Dávila JC, Real MA, Guirado S. 1996. Intrinsic connections in the anterior dorsal ventricular ridge of the lizard *Psammodromus algirus*. *J Comp Neurol.* 372:49-58.
- Aste N, Balthazart J, Absil P, Grossmann R, Müllbauer E, Viglietti-Panzica C, Panzica GC. 1998. Anatomical and neurochemical definition of the nucleus of the stria terminalis in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *J Comp Neurol.* 396:141-157.
- Atoji Y, Wild JM. 2004. Fiber connections of the hippocampal formation and septum and subdivisions of the hippocampal formation in the pigeon as revealed by tract tracing and kainic acid lesions. *J Comp Neurol.* 475:426-461.
- Atoji Y, Shibata N, Yamamoto Y, Suzuki Y. 1996. Distribution of neurotensin-containing neurons in the central nervous system of the pigeon and the chicken. *J Comp Neurol.* 375:187-211.
- Atoji Y, Saito S, Wild JM. 2006. Fiber connections of the compact division of the posterior pallial amygdala and lateral part of the bed nucleus of the stria terminalis in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol.* 499:161-182.
- Bakker J, Kelliher KR, Baum MJ. 2001. Mating induces gonadotropin-releasing hormone neuronal activation in anosmic female ferrets. *Biol Reprod.* 64:1100-1105.
- Balaban CD, Ulinski PS. 1981. Organization of thalamic afferents to anterior dorsal ventricular ridge in turtles. II. Properties of the rotundo-dorsal map. *J Comp Neurol.* 200:131-150.
- Balthazart J, Gahr M, Surlemont C. 1989. Distribution of estrogen receptors in the brain of the Japanese quail: an immunocytochemical study. *Brain Res.* 501:205-214.
- Balthazart J, Foidart A, Wilson EM, Ball GF. 1992. Immunocytochemical localization of androgen receptors in the male songbird and quail brain. *J. Comp. Neurol.* 317:407-420.
- Baxter MG, Murray EA. 2002. The amygdala and reward. *Nat Rev Neurosci.* 3:563-573.
- Beauchamp GK, Martin IG, Wysocki CJ, Wellington JL. 1982. Chemoinvestigatory and sexual behavior of male guinea pigs

- following vomeronasal organ removal. *Physiol Behav.* 29: 329-336.
- Beauchamp GK, Wysocki CJ, Wellington JL. 1985. Extinction of response to urine odor as a consequence of vomeronasal organ removal in male guinea pigs. *Behav Neurosci.* 99:950-955.
- Behan M, Haberly LB. 1999. Intrinsic and efferent connections of the endopiriform nucleus in rat. *J Comp Neurol.* 408:532-548.
- Belekhova MG, Chkheidze DD. 1991. Afferent and efferent connections of the amygdaloid complex with the anterior dorsal ventricular ridge of the telencephalon of the turtle *Emys orbicularis*: peroxidase study. *Zh Evol Biokhi Fiziol.* 27:757-767.
- Belekhova MG, Chkheidze DD. 1992. Connections of the amygdaloid complex with basotelencephalic, diencephalic and brainstem structures in turtles: HRP study. *Rusa Zh Evol Biokhi Fiziol.* 28:614-622.
- Beltramino C, Taleisnik S. 1983. Release of LH in the female rat by olfactory stimuli. Effect of the removal of the vomeronasal organs or lesioning of the accessory olfactory bulbs. *Neuroendocrinology.* 36:53-58.
- Beltramino C, Taleisnik S. 1985. Ventral premammillary nuclei mediate pheromonal-induced LH release stimuli in the rat. *Neuroendocrinology.* 41:119-124.
- Benowitz LI, Karten HJ. 1976. Organization of the tectofugal visual pathway in the pigeon: a retrograde transport study. *J Comp Neurol.* 167:503-520.
- Berk ML. 1987. Projections of the lateral hypothalamus and bed nucleus of the stria terminalis to the dorsal vagal complex in the pigeon. *J Comp Neurol.* 260:140-156.
- Blaustein JD, Erskine MS. 2002. Feminine sexual behavior: Cellular integration of hormonal and afferent information in the rodent brain. En: editores Pfaff DW et al. *Hormones Brain and Behavior*, Vol. 1. San Diego: Academic Press. p 139-214.
- Blundell P, Hall G, Killcross S. 2001. Lesions of the basolateral amygdala disrupt selective aspects of reinforcer representation in rats. *J Neurosci.* 21:9018-9026.
- Borszcz GS. 1993. The capacity of motor reflex and vocalization thresholds to support avoidance conditioning in the rat. *Behav Neurosci.* 107:678-693.
- Borszcz GS. 1995. Pavlovian conditional vocalizations of the rat: a model system for analyzing the fear of pain. *Behav Neurosci.* 109:648-662.
- Borszcz GS, Leaton RN. 2003. The effect of amygdala lesions on conditional and unconditional vocalizations in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 79:212-225.
- Bourgeois L, Gauriau C, Bernard JF. 2001. Projections from the nociceptive area of the central nucleus of the amygdala to the forebrain: a PHA-L study in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 14:229-255.
- Brauth, SE, Kitt CA. 1980. The paleostriatal system of *Caiman crocodilus*. *J Comp Neurol.* 189:437-465.
- Brinley-Reed M, McDonald AJ. 1999. Evidence that dopaminergic axons provide a dense innervation of specific neuronal

- subpopulations in the rat basolateral amygdala. *Brain Res.* 850:127-135.
- Broadwell RD. 1975. Olfactory relationships of the telencephalon and diencephalon in the rabbit. I. An autoradiographic study of the efferent connections of the main and accessory olfactory bulbs. *J Comp Neurol.* 163:329-345.
- Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm DS. 1993. The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J Comp Neurol.* 338:255-278.
- Bruce LL, Butler AB. 1984a. Telencephalic connections in lizards. I. Projections to cortex. *J Comp Neurol.* 229:585-601.
- Bruce LL, Butler AB. 1984b. Telencephalic connections in lizards. II. Projections to anterior dorsal ventricular ridge. *J Comp Neurol.* 229:602-615.
- Bruce LL, Neary TJ. 1995a. Afferent projections to the ventromedial hypothalamic nucleus in a lizard, *Gekko gekko*. *Brain Behav Evol.* 46:14-29.
- Bruce LL, Neary TJ. 1995b. The limbic system of tetrapods: a comparative analysis of cortical and amigdalar populations. *Brain Behav Evol.* 46:224-234.
- Bubar MJ, Cunningham KA. 2006. Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors as potential targets for modulation of psychostimulant use and dependence. *Curr Top Med Chem.* 6:1971-1985.
- Butler AB. 1994a. The evolution of the dorsal pallium in the telencephalon of amniotes: cladistic analysis and a new hypothesis. *Brain Res Rev.* 19:66-101.
- Butler AB. 1994b. The evolution of the dorsal thalamus of jawed vertebrates, including mammals: cladistic analysis and a new hypothesis. *Brain Res Brain Res Rev.* 19:29-65.
- Cador M, Robbins TW, Everitt BJ. 1989. Involvement of the amigdala in stimulus-reward associations: interaction with the ventral striatum. *Neuroscience.* 30:77-86.
- Calleja J. 1893. *La Region Olfactoria del Cerebro*. Editor: N. Moya. Madrid.
- Canteras NS. 2002. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacol Biochem Behav.* 71:481-491.
- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. 1992. Connections of the posterior nucleus of the amygdala. *J Comp Neurol.* 324:143-179.
- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. 1995. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol.* 360:213-245.
- Cardinal RN, Winstanley CA, Robbins TW, Everitt BJ. 2004. Limbic corticostriatal systems and delayed reinforcement. *Ann N Y Acad Sci.* 1021:33-50.
- Carroll RS, Erskine MS, Doherty PC, Lundell LA, Baum MJ. 1985. Coital stimuli controlling luteinizing hormone secretion and ovulation in the female ferret. *Biol Reprod.* 32:925-933.
- Cassell MD, Freedman LJ, Shi C. 1999. The intrinsic organization of the central extended amygdala. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 877:217-241.
- Cheng M, Chaiken M, Zuo M, Miller H. 1999. Nucleus taenia of the amygdala of birds:

- anatomical and functional studies in ring doves (*Streptopelia risoria*) and European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Brain Behav Evol.* 53:243-270.
- Chkheidze, DD, Belekova MG. 1992. Afferent and efferent communications of amygdaloid complex with telencephalic formations and the olfactory bulb in turtles: research with peroxidase technique. *Zh Evol Bioki Fiziol.* 28:481-491.
- Choi JS, Brown TH. 2003. Central amygdala lesions block ultrasonic vocalization and freezing as conditional but not unconditional responses. *J Neurosci.* 23:8713-8721.
- Choi GB, Dong HW, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Swanson LW, Anderson DJ. 2005. Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron.* 46:647-660.
- Clancy AN, Coquelin A, Macrides F, Gorski RA, Noble EP. 1984. Sexual behavior and aggression in male mice: involvement of the vomeronasal system. *J Neurosci.* 4:2222-2229.
- Coquelin A, Clancy AN, Macrides F, Noble EP, Gorski RA. 1984. Pheromonally induced release of luteinizing hormone in male mice: involvement of the vomeronasal system. *J Neurosci.* 4:2230-2236.
- Cordery P, Molnar Z. 1999. Embryonic development of connections in turtle pallium. *J Comp Neurol.* 413:26-54.
- Danielsen EH, Magnuson DJ, Gray TS. 1989. The central amygdaloid nucleus innervation of the dorsal vagal complex in rat: a *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin lectin anterograde tracing study. *Brain Res. Bull.* 22:705-715.
- Davies DC, Csillag A, Székely AD, Kabai P. 1997. Efferent connections of the domestic chick archistriatum: a *Phaseolus* lectin anterograde tracing study. *J Comp Neurol.* 389:679-693.
- Davies DC, Martínez-García F, Lanuza E, Novejarque A. 2002. Striato-amygdaloid transition area lesions reduce the duration of tonic immobility in the lizard *Podarcis hispanica*. *Brain Res Bull.* 57:537-541.
- Dávila JC, Andreu MJ, Real MA, Puelles L, Guirado S. 2002. Mesencephalic and diencephalic afferent connections to the thalamic nucleus rotundus in the lizard, *Psammotromus algirus*. *Eur J Neurosci.* 16:267-282.
- Davis M. 1994. The role of the amygdala in emotional learning. *Int Rev Neurobiol.* 36:225-266.
- Davis M, Shi C. 1999. The extended amygdala: are the central nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis differentially involved in fear versus anxiety? *Ann N Y Acad Sci.* 877:281-291.
- Day HE, Masini CV, Campeau S. 2004. The pattern of brain *c-fos* mRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics. *Brain Res.* 1025:139-151.
- Dayas CV, Buller KM, Day TA. 1999. Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the

- central amygdala. *Eur J Neurosci.* 11:2312-2322.
- De Olmos JS, Heimer L. 1999. The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. *Ann N Y Acad Sci.* 877:1-32.
- Del Punta K, Leinders-Zufall T, Rodriguez I, Jukam D, Wysocki CJ, Ogawa S, Zufall F, Mombaerts P. 2002. Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. *Nature.* 419:70-74.
- Dielenberg RA, McGregor IS. 1999. Habituation of the hiding response to cat odor in rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol.* 113:376-387.
- Dielenberg RA, McGregor IS. 2001. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neurosci Biobehav Rev.* 25:597-609.
- Distel H. 1978. Behavioral responses to the electrical stimulation of the brain in the green iguana. En: editores Grennberg N, MacLean PD. *Behavioral Neurology of Lizards.* Bethesda: NIMH. p 135-147.
- Divac I, Mogensen J. 1985. The prefrontal "cortex" in the pigeon catecholamine histofluorescence. *Neuroscience.* 15:677-682.
- Divac I, Mogensen J, Bjorklund A. 1985. The prefrontal 'cortex' in the pigeon. Biochemical evidence. *Brain Res.* 332:365-368.
- Dobson H, Ghuman S, Prabhakar S, Smith R. 2003. A conceptual model of the influence of stress on female reproduction. *Reproduction.* 125:151-163.
- Dong HW, Swanson LW. 2003. Projections from the rhomboid nucleus of the bed nuclei of the stria terminalis: implications for cerebral hemisphere regulation of ingestive behaviors. *J. Comp Neurol.* 463:434-472.
- Dong HW, Swanson LW. 2004. Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nuclei of the stria terminalis. *J. Comp Neurol.* 468:277-298.
- Dong HW, Petrovich GD, Swanson LW. 2001. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res Rev.* 38:192-246.
- Drevets WC, Gautier C, Price JC, Kupfer DJ, Kinahan PE, Grace AA, Price JL, Mathis CA. 2001. Amphetamine-induced dopamine release in human ventral striatum correlates with euphoria. *Biol Psychiatry.* 49:81-96.
- Dubbeldam JL, Brauch CS, Don A. 1981. Studies on the somatotopy of the trigeminal system in the mallard, *Anas platyrhynchos L.* III. Afferents and organization of the nucleus basalis. *J Comp Neurol.* 196:391-405.
- Dubbeldam JL, den Boer-Visser AM, Bout RG. 1997. Organization and efferent connections of the archistriatum of the mallard, *Anas platyrhynchos L.*: an anterograde and retrograde tracing study. *J Comp Neurol.* 388:632-657.
- Dujardin E, Jurgens U. 2005. Afferents of vocalization-controlling periaqueductal regions in the squirrel monkey. *Brain Res.* 1034:114-131.
- Durand SE, Tepper JM, Cheng MF. 1992. The shell region of the nucleus ovoidalis: a

- subdivision of the avian auditory thalamus. *J Comp Neurol.* 323:495-518.
- Durstewitz D, Kröner S, Güntürkün O. 1999. The dopaminergic innervation of the avian telencephalon. *Prog. Neurobiol.* 59:161-195.
- Endepols H, Roden K, Luksch H, Dicke U, Walkowiak W. 2004. Dorsal striatopallidal system in anurans. *J Comp Neurol.* 468:299-310.
- Everitt BJ, Cador M, Robbins TW. 1989. Interactions between the amygdala and ventral striatum in stimulus-reward associations: studies using a second-order schedule of sexual reinforcement. *Neuroscience.* 30:63-75.
- Everitt BJ, Morris KA, O'Brien A, Robbins TW. 1991. The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes. *Neuroscience.* 42:1-18.
- Everitt BJ, Parkinson JA, Olmstead MC, Arroyo M, Robledo P, Robbins TW. 1999. Associative processes in addiction and reward. The role of amygdala-ventral striatal subsystems. *Ann N Y Acad Sci.* 877:412-438.
- Everitt BJ, Cardinal RN, Parkinson JA, Robbins TW. 2003. Appetitive behavior: impact of amygdala-dependent mechanisms of emotional learning. *Ann N Y Acad Sci.* 985:233-250.
- Fallon JH. 1983. The islands of Calleja complex of rat basal forebrain II: connections of medium and large sized cells. *Brain Res Bull.* 10:775-793.
- Fallon JH, Riley JN, Sipe JC, Moore RY. 1978. The islands of Calleja: organization and connections. *J Comp Neurol.* 181:375-395.
- Fallon JH, Loughlin SE, Ribak CE. 1983. The islands of Calleja complex of rat basal forebrain. III. Histochemical evidence for a striatopallidal system. *J Comp Neurol.* 218:91-120.
- Fernández-Fewell GD, Meredith M. 1994. *c-fos* expression in vomeronasal pathways of mated or pheromone-stimulated male golden hamsters: contributions from vomeronasal sensory input and expression related to mating performance. *J Neurosci.* 14:3643-3654.
- Fernández-Fewell GD, Meredith M. 1998. Olfactory contribution to Fos expression during mating in inexperienced male hamsters. *Chem Senses.* 23:257-267.
- Fewell GD, Meredith M. 2002. Experience facilitates vomeronasal and olfactory influence on Fos expression in medial preoptic area during pheromone exposure or mating in male hamsters. *Brain Res.* 941:91-106.
- Foidart A, Meddle SL, Balthazart J. 1999. Mating-induced Fos and aromatase are not co-localized in the preoptic area. *NeuroReport* 10:907-912.
- Font C, Hoogland PV, Vermeulen-VanderZee E, Pérez-Clausell J, Martínez-García F. 1995. The septal complex of the telencephalon of the lizard *Podarcis hispanica*. I. Chemoarchitectonical organization. *J Comp Neurol.* 359:117-130.
- Font C, Martínez-Marcos A, Lanuza E, Hoogland PV, Martínez-García, F. 1997. Septal complex of the telencephalon of the lizard *Podarcis hispanica*. II. Afferent

- connections. *J. Comp Neurol.* 383:489-511.
- Font C, Lanuza E, Martínez-Marcos A, Hoogland PV, Martínez-García F. 1998. Septal complex of the telencephalon of lizards: III. Efferent connections and general discussion. *J Comp Neurol.* 401:525-548.
- Foster RE, Hall WC. 1978. The organization of central auditory pathways in a reptile, *Iguana iguana*. *J Comp Neurol.* 178:783-831.
- Friedman DP, Aggleton JP, Saunders RC. 2002. Comparison of hippocampal, amygdala, and perirhinal projections to the nucleus accumbens: combined anterograde and retrograde tracing study in the Macaque brain. *J Comp Neurol.* 450:345-365.
- Fudge JL, Haber SN. 2002. Defining the caudal ventral striatum in primates: cellular and histochemical features. *J Neurosci.* 22:10078-10082.
- Fudge JL, Kunishio K, Walsh P, Richard C, Haber SN. 2002. Amygdaloid projections to ventromedial striatal subterritories in the primate. *Neuroscience.* 110:257-275.
- Fudge JL, Breitbart MA, McClain C. 2004. Amygdaloid inputs define a caudal component of the ventral striatum in primates. *J Comp Neurol.* 476:330-347.
- Funke K. 1989. Somatosensory areas in the telencephalon of the pigeon. II. Spinal pathways and afferent connections. *Exp Brain Res.* 76:620-638.
- Fusé T, Forsyth JP, Marx B, Gallup GG, Weaver S. 2007. Factor structure of the Tonic Immobility Scale in female sexual assault survivors: an exploratory and Confirmatory Factor Analysis. *J Anxiety Disord.* 21:265-283.
- Gamlin PD, Cohen DH. 1986. A second ascending visual pathway from the optic tectum to the telencephalon in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol.* 250:296-310.
- Gauriau C, Bernard JF. 2002. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp Physiol.* 87:251-258.
- Geneser-Jensen FA, Blackstad TW. 1971. Distribution of acetyl cholinesterase in the hippocampal region of the guinea pig. I. Entorhinal area, parasubiculum, and presubiculum. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 114:460-481.
- Gerfen CR. 1992. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci.* 15:133-139.
- Gerfen CR. 2004. Basal Ganglia. En: editor Paxinos G. *The Rat Nervous System*, tercera edición. San Diego: Academic Pres. p 455-508.
- Gomez DM, Newman SW. 1992. Differential projections of the anterior and posterior regions of the medial amygdaloid nucleus in the Syrian hamster. *J Comp Neurol.* 317:195-218.
- González A, Russchen FT, Lohman AH. 1990. Afferent connections of the striatum and the nucleus accumbens in the lizard *Gekko gecko*. *Brain Behav Evol.* 36:39-58.
- Goodson JL. 1998a. Territorial aggression and dawn song are modulated by septal vasotocin and vasoactive intestinal polypeptide in male field sparrows (*Spizella pusilla*). *Horm Behav.* 34:67-77.
- Goodson JL. 1998b. Vasotocin and vasoactive intestinal polypeptide modulate aggression in a territorial songbird, the

- violet-eared waxbill (*Estrildidae: Uraeginthus granatina*). Gen Comp Endocrinol. 111:233-244.
- Goodson JL, Adkins-Regan E. 1999. Effect of intraseptal vasotocin and vasoactive intestinal polypeptide infusions on courtship song and aggression in the male zebra finch (*Taeniopygia guttata*). J Neuroendocrinol. 11:19-25.
- Goodson JL, Bass AH. 2001. Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin/vasopressin systems in vertebrates. Brain Res Rev. 35:246-265.
- Goodson JL, Lindberg L, Johnson P. 2004. Effects of central vasotocin and mesotocin manipulations on social behavior in male and female zebra finches. Horm Behav. 45:136-143.
- Groenewegen HJ, Becker NE, Lohman AH. 1980. Subcortical afferents of the nucleus accumbens septi in the cat, studied with retrograde axonal transport of horseradish peroxidase and bisbenzimid. Neuroscience. 5:1903-1916.
- Groenewegen HJ, Vermeulen-VanderZee E, te Kortschot A, Witter MP. 1987. Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat. A study using anterograde transport of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. Neuroscience. 23:103-120.
- Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AV, Voorn P. 1999. Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. Ann N Y Acad Sci. 877:49-63.
- Guirado S, Dávila JC. 2002. Thalamo-telencephalic connections: new insights on the cortical organization in reptiles. Brain Res Bull. 57:451-454.
- Guirado S, Dávila JC, Real MA, Medina L. 1999. Nucleus accumbens in the lizard *Psammodromus algirus*: chemoarchitecture and cortical afferent connections. J Comp Neurol. 405:15-31.
- Guirado S, Dávila JC, Real MA, Medina L. 2000. Light and electron microscopic evidence for projections from the thalamic nucleus rotundus to targets in the basal ganglia, the dorsal ventricular ridge, and the amygdaloid complex in a lizard. J Comp Neurol. 424:216-32.
- Haber SN, Kim KS, Maily P, Calzavara R. 2006. Reward-related cortical inputs define a large striatal region in primates that interface with associative cortical connections, providing a substrate for incentive-based learning. J Neurosci. 26:8368-8376.
- Halem HA, Cherry JA, Baum MJ. 1999. Vomeronasal neuroepithelium and forebrain Fos responses to male pheromones in male and female mice. J Neurobiol. 39:249-263.
- Hall JA, Foster RE, Ebner FF, Hall WC. 1977. Visual cortex in a reptile, the turtle (*Pseudemys scripta* and *Chrysemys picta*). Brain Res 130:197-216.
- Halliday G, Harding A, Paxinos G. 1995. Serotonin and tachykinin systems. En: editor Paxinos G. The Rat Nervous System. San Diego: Academic Press. p 929-974.
- Halpern M. 1987. The organization and function of the vomeronasal system. Annu Rev Neurosci. 10:325-362.

- Halpern M, Morrell JI, Pfaff DW. 1982. Cellular [3H]estradiol and [3H]testosterone localization in the brains of garter snakes: an autoradiographic study. *Gen. Comp Endocrinol.* 46:211-224.
- Halpern M, Martínez-Marcos A. 2003. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog Neurobiol.* 70:245-318.
- Hatanaka T, Matsuzaki O. 1993. Odor responses of the vomeronasal system in Reeve's turtle, *Geoclemys reevesii*. *Brain Behav Evol.* 41:183-186.
- Hatfield T, Han JS, Conley M, Gallagher M, Holland P. 1996. Neurotoxic lesions of basolateral, but not central, amygdala interfere with Pavlovian second-order conditioning and reinforcer devaluation effects. *J Neurosci.* 16:5256-5265.
- Hecker S, Mesulam MM. 1994. Two types of cholinergic projections to the rat amygdala. *Neuroscience* 60:383-397.
- Heimer L, Wilson RD. 1975. The subcortical projections of allocortex: similarities in the neuronal associations of the hippocampus, the piriform cortex and the neocortex. In *Golgi Centennial Symposium Proceedings*, (M.Santini, ed), pp. 173-193. Raven Press, New York.
- Holmgren N. 1925. Points of view concerning forebrain morphology in higher vertebrates. *Acta Zool Stockh.* 6:415-477.
- Holland PC, Gallagher M. 2004. Amygdala-frontal interactions and reward expectancy. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14:148-155.
- Hoogland PV. 1977. Efferent connections of the striatum in *Tupinambis nigropunctatus*. *J Morphol.* 152:229-246.
- Hoogland PV, Vermeulen-Vanderzee E. 1989. Efferent connections of the dorsal cortex of the lizard *Gekko gekko* studied with *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin. *J Comp Neurol.* 285:289-303
- Hoogland PV, Vermeulen-VanderZee E. 1990. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the telencephalon of the lizard *Gekko gekko*. *Brain Behav Evol.* 36:378-390.
- Hoogland, P.V. and Vermeulen-Vanderzee, E. 1995. Efferent connections of the lateral cortex of the lizard *Gekko gekko*: evidence for separate origins of medial and lateral pathways from the lateral cortex to the hypothalamus. *J. Comp Neurol.* 352:469-480.
- Hull EM, Meisel RL, Sachs BD. 2002. Male sexual behavior. In: Pfaff DW et al., editors. *Brain Hormones and Behavior*. San Diego: Academic Press. 0-12-532105-8, p 1-138.
- Hurst JL, Beynon RJ. 2004. Scent wars: the chemobiology of competitive signalling in mice. *Bioessays.* 26:1288-1298.
- Ikemoto S. 2003. Involvement of the olfactory tubercle in cocaine reward: intracranial self-administration studies. *J Neurosci.* 23:9305-9311.
- Ikemoto S, Qin M, Liu Z-H. 2005. The functional divide for primary reinforcement of D-amphetamine lies between the medial and lateral ventral striatum: is the division of the accumbens core, shell, and olfactory tubercle valid? *J Neurosci.* 25:5061-5065.
- Izawa E, Yanagihara S, Atsumi T, Matsushima T. 2001. The role of basal ganglia in reinforcement learning and imprinting in

- domestic chicks. *NeuroReport*. 12:1743-1747.
- Izawa E, Zachar G, Aoki N, Koga K, Matsushima T. 2002. Lesions of the ventro-medial basal ganglia impair the reinforcement but not the recall of memorized color discrimination in domestic chicks. *Behav Brain Res*. 136:405-414.
- Izawa E, Zachar G, Yanagihara S, Matsushima T. 2003. Localized lesion of caudal part of lobus parolfactorius caused impulsive choice in the domestic chick: evolutionarily conserved function of ventral striatum. *J Neurosci*. 23:1894-1902.
- Jansson A, Tinner B, Bancila M, Verge D, Steinbusch HW, Agnati LF, Fuxe K. 2001. Relationships of 5-hydroxytryptamine immunoreactive terminal-like varicosities to 5-hydroxytryptamine-2A receptor-immunoreactive neuronal processes in the rat forebrain. *J Chem Neuroanat*. 22:185-203.
- Jarvis ED, Gunturkun O, Bruce L, Csillag A, Karten H, Kuenzel W, Medina L, Paxinos G, Perkel DJ, Shimizu T, Striedter G, Wild JM, Ball GF, Dugas-Ford J, Durand SE, Hough GE, Husband S, Kubikova L, Lee DW, Mello CV, Powers A, Siang C, Smulders TV, Wada K, White SA, Yamamoto K, Yu J, Reiner A, Butler AB; Avian Brain Nomenclature Consortium. Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution. 2005. *Nat Rev Neurosci*. 6:151-159.
- Joel D, Weiner I. 1994. The organization of the basal ganglia-thalamocortical circuits: open interconnected rather than closed segregated. *Neurosci*. 63:363-379.
- Joel D, Weiner I. 2000. The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. *Neurosci*. 96:451-474.
- Johnston JB. 1923. Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. *J Comp Neurol*. 35:337-481.
- Jongen-Relo AL, Voorn P, Groenewegen HJ. 1994. Immunohistochemical characterization of the shell and core territories of the nucleus accumbens in the rat. *Eur J Neurosci*. 6:1255-1264.
- Jurgens U. 1982. Amygdalar vocalization pathways in the squirrel monkey. *Brain Res*. 241:189-196.
- Kaas JH, Reiner A. 1999. The neocortex comes together. *Nature*. 399:418-419.
- Kalenscher T, Diekamp B, Guntürkün O. 2003. Neural architecture of choice behaviour in a concurrent interval schedule. *Eur J Neurosci*. 18:2627-2637.
- Kalin NH, Shelton SE, Davidson RJ. 2004. The role of the central nucleus of the amygdala in mediating fear and anxiety in the primate. *J Neurosci*. 24:5506-5515.
- Kalman M, Pritz MB. 2001. Glial fibrillary acidic protein-immunopositive structures in the brain of a Crocodylian, *Caiman crocodylus*, and its bearing on the evolution of astroglia. *J Comp Neurol*. 431:460-480.
- Kalman M, Szekely AD, Csillag A. 1993. Distribution of glial fibrillary acidic protein-immunopositive structures in the brain of the domestic chicken (*Gallus*

- domesticus*). J. Comp. Neurol. 330:221-237.
- Kalman M, Szekely AD, Csillag A. 1998. Distribution of glial fibrillary acidic protein and vimentin-immunopositive elements in the developing chicken brain from hatch to adulthood. Anat. Embryol (Berl). 198:213-235.
- Kane F, Coulombe D, Miliaris E. 1991. Amygdaloid self-stimulation: a movable electrode mapping study. Behav Neurosci. 105:926-932.
- Karten HJ. 1967. The organization of the ascending auditory pathway in the pigeon (*Columba livia*). I. Diencephalic projections of the inferior colliculus (*nucleus mesencephali lateralis, pars dorsalis*). Brain Res. 6:409-427.
- Karten HJ. 1968. The ascending auditory pathway in the pigeon (*Columba livia*). II. Telencephalic projections of the *nucleus ovoidalis thalami*. Brain Res. 11:134-153.
- Karten HJ. 1969. The organization of the avian telencephalon and some speculations on the phylogeny of the amniote telencephalon. Ann N Y Acad Sci. 167:164-180.
- Karten HJ. 1991. Homology and evolutionary origins of the neocortex. Brain Behav Evol. 38:264-272.
- Karten HJ. 1997. Evolutionary development biology meets the brain: the origins of mammalian cortex. Proc Natl Acad Sci USA. 94:2800-2804.
- Karten H J, Shimizu T. 1989. The origins of neocortex: connections and laminations as distinct events in evolution. J Cognit Neurosci. 4:291-301.
- Karten HJ, Hodos W, Nauta WJ, Revzin AM. 1973. Neural connections of the "visual wulst" of the avian telencephalon. Experimental studies in the pigeon (*Columba livia*) and owl (*Speotyto cunicularia*). J Comp Neurol. 150:253-278.
- Keating EG, Kormann LA, Horel JA. 1970. The behavioral effects of stimulating and ablating the reptilian amygdala (*Caiman sklerops*). Physiol Behav. 5:55-59.
- Kelley AE. 2004. Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. Neurosci Biobehav Rev. 27:765-776.
- Kelley AE, Domesick VB, Nauta WJH. 1982. The amygdalostriatal projection in the rat - An anatomical study by anterograde and retrograde tracing methods. Neuroscience. 7:615-630.
- Kenigfest N, Martínez-Marcos A, Belekchova M, Font C, Lanuza E, Desfilis E, Martínez-García F. 1997. A lacertilian dorsal retinorecipient thalamus: a re-investigation in the old-world lizard *Podarcis hispanica*. Brain Behav Evol. 50:313-334.
- Kevetter GA, Winans SS. 1981. Connections of the corticomедial amygdala in the golden hamster. I. Efferents of the "Vomeronasal amygdala". J. Comp. Neurol. 197:81-98.
- Kohler C, Chan-Palay V, Wu J-Y. 1984. Septal neurons containing glutamic acid decarboxylase immunoreactivity project to the hippocampal region in the rat brain. Anat Embryol. 169:41-44.
- Kollack-Walker S, Newman SW. 1995. Mating and agonistic behavior produce different patterns of fos immunolabeling in the

- mle syrian hamster brain. *Neurosci.* 66:721-736.
- Kornetsky C, Huston-Lyons D, Porrino LJ. 1991. The role of the olfactory tubercle in the effects of cocaine, morphine and brain-stimulation reward. *Brain Res.* 541:75-81.
- Krettek JE, Price JL. 1978. Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *J Comp Neurol.* 178:225-254.
- Kröner S, Güntürkün O. 1999. Afferent and efferent connections of the caudolateral neostriatum in the pigeon (*Columba livia*): A retro- and anterograde pathway tracing study. *J Comp Neurol.* 407:228-260.
- Kruger L, Mantyh PW, Sternini C, Brecha NC, Mantyh CR. 1988. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the rat central nervous system: patterns of immunoreactivity and receptor binding sites. *Brain Res.* 463:223-244.
- Kuan CY, Elliott EA, Flavell RA, Rakic P. 1997. Restrictive clonal allocation in the chimeric mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:3374-3379.
- Kubo T, Okatani H, Nishigori Y, Hagiwara Y, Fukumori R, Goshima Y. 2004. Involvement of the medial amygdaloid nucleus in restraint stress-induced pressor responses in rats. *Neurosci Lett.* 354:84-86.
- Lanuza E, Halpern M. 1997. Afferent and efferent connections of the nucleus sphericus in the snake *Thamnophis sirtalis*: Convergence of olfactory and vomeronasal information in the lateral cortex and the amygdala. *J Comp Neurol.* 385:627-640.
- Lanuza E, Halpern M. 1998. Efferents and centrifugal afferents of the main and accessory olfactory bulbs in the snake *Thamnophis sirtalis*. *Brain Behav. Evol.* 51:1-22.
- Lanuza E, Font C, Martínez-Marcos A, Martínez-García F. 1997. Amygdalo-hypothalamic projections in the lizard *Podarcis hispanica*: a combined anterograde and retrograde tracing study. *J Comp Neurol.* 384:537-555.
- Lanuza E, Belekova M, Martínez-Marcos A, Font C, Martínez-García F. 1998. Identification of the reptilian basolateral amygdala: an anatomical investigation of the afferents to the posterior dorsal ventricular ridge of the lizard *Podarcis hispanica*. *Eur J Neurosci.* 10:3517-3534.
- Lanuza E, Davies DC, Landete JM, Novejarque A, Martínez-García F. 2000. Distribution of CGRP-like immunoreactivity in the chick and quail brain. *J Comp Neurol.* 421:515-532.
- Lanuza E, Novejarque A, Moncho-Bogani J, Hernández A, Martínez-García F. 2002. Understanding the basic circuitry of the cerebral hemispheres: the case of lizards and its implications in the evolution of the telencephalon. *Brain Res Bull.* 57:471-473.
- Ledoux JE. 2000. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci.* 23:155-184.
- Ledoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ. 1988. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J Neurosci.* 8:2517-2529.
- Ledoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, Romanski LM. 1990. The lateral amygdaloid

- nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J Neurosci.* 10:1062-1069.
- Lee HJ, Choi JS, Brown TH, Kim JJ. 2001. Amygdalar nmda receptors are critical for the expression of multiple conditioned fear responses. *J Neurosci.* 21:4116-4124.
- Leite-Panissi CR, Menescal-de-Oliveira L. 2002. Central nucleus of the amygdala and the control of tonic immobility in guinea pigs. *Brain Res Bull.* 58:13-19.
- Leite-Panissi CR, Rodrigues CL, Brentegani MR, Menescal-de-Oliveira L. 2001. Endogenous opiate analgesia induced by tonic immobility in guinea pigs. *Braz J Med Biol Res.* 34:245-250.
- Leite-Panissi CR, Coimbra NC, Menescal-de-Oliveira L. 2003. The cholinergic stimulation of the central amygdala modifying the tonic immobility response and antinociception in guinea pigs depends on the ventrolateral periaqueductal gray. *Brain Res Bull.* 60:167-178.
- Leite-Panissi CR, Brentegani MR, Menescal-de-Oliveira L. 2004. Cholinergic-opioidergic interaction in the central amygdala induces antinociception in the guinea pig. *Braz J Med Biol Res.* 37:1571-1579.
- Leybold BG, Yu CR, Leinders-Zufall T, Kim MM, Zufall F, Axel R. 2002. Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:6376-6381.
- Li CI, Maglinao TL, Takahashi LK. 2004. Medial amygdala modulation of predator odor-induced unconditioned fear in the rat. *Behav Neurosci.* 118:324-332.
- Lohman AHM, Smeets JAJ. 1990. The dorsal ventricular ridge and cortex of reptiles in historical and phylogenetic perspective. En: editores Finley BL et al. *The Neocortex: Ontogeny and Phylogeny.* New York: Plenum Press. p 59-74.
- Lohman AH, Smeets WJ. 1993. Overview of the main and accessory olfactory bulb projections in reptiles. *Brain Behav Evol.* 41:147-155.
- Lohman AHM, van Woerden-Verkley I. 1978. Ascending connections to the forebrain in the Tegu lizard. *J Comp Neurol.* 182:555-594.
- Lowndes M, Davies DC. 1996. The effect of archistriatal lesions on "open field" and fear/avoidance behavior in the domestic chick. *Behav Brain Res.* 72:25-32.
- Lu B, Leygue E, Dotzlaw H, Murphy LJ, Murphy LC, Watson PH. 1998. Estrogen receptor-beta mRNA variants in human and murine tissues. *Mol. Cell Endocrinol.* 138:199-203.
- Luo M, Fee MS, Katz LC. 2003. Encoding pheromonal signals in the accessory olfactory bulb of behaving mice. *Science.* 299:1196-1201.
- Ma S, Morilak DA. 2004. Induction of FOS expression by acute immobilization stress is reduced in locus coeruleus and medial amygdala of Wistar-Kyoto rats compared to Sprague-Dawley rats. *Neuroscience.* 124:963-972.
- MacLean PD. 1990. *The Triune Brain in Evolution.* New York: Plenum Press.

- Majak K, Pitkanen A. 2003. Projections from the periamygdaloid cortex to the amygdaloid complex, the hippocampal formation, and the parahippocampal region: a PHA-L study in the rat. *Hippocampus* 13:922-942.
- Manger PR, Slutsky DA, Molnar Z. 2002. Visual subdivisions of the dorsal ventricular ridge of the iguana (*Iguana iguana*) as determined by electrophysiologic mapping. *J Comp Neurol*. 453:226-246.
- Maren S, Quirk GJ. 2004. Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci*. 5:844-852.
- Marín O, Smeets WJ, Gonzalez A. 1997. Basal ganglia organization in amphibians: catecholaminergic innervation of the striatum and the nucleus accumbens. *J Comp Neurol*. 378:50-69.
- Marín O, Rubenstein JL. 2003. Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci*. 26:441-483.
- Martínez D, Slifstein M, Broft A, Mawlawi O, Hwang DR, Huang Y, Cooper T, Kegeles L, Zarah E, Abi-Dargham A, Haber SN, Laruelle M. 2003. Imaging human mesolimbic dopamine transmission with positron emission tomography. Part II: amphetamine-induced dopamine release in the functional subdivisions of the striatum. *J Cereb Blood Flow Metab*. 23:285-300.
- Martínez-García, F. 2003. The origin of the amniote sensory and motor cortices. *Behav Brain Sci*. 26:561-562.
- Martínez-García F, Olucha FE. 1988. Afferent projections to the Timm-positive cortical areas of the telencephalon of lizards. En: editores Schwerdtfeger WK, Smeets WJAJ. *The Forebrain of Reptiles. Current concepts of structure and function*. Basel: Karger. p 30-40.
- Martínez-García F, Amiguet M, Olucha F, López-García C. 1986. Connections of the lateral cortex in the lizard *Podarcis hispanica*. *Neurosci Lett*. 63:39-44.
- Martínez-García F, Olucha FE, Teruel V, Lorente MJ, Schwerdtfeger WK. 1991. Afferent and efferent connections of the olfactory bulbs in the lizard *Podarcis hispanica*. *J Comp Neurol*. 305:337-347.
- Martínez-García F, Olucha FE, Teruel V, Lorente MJ. 1993. Fiber connections of the amygdaloid formation of the lizard *Podarcis hispanica*. *Brain Behav Evol*. 41:156-162.
- Martínez-García F, Martínez-Marcos A, Lanuza E. 2002a. The pallial amygdala of amniote vertebrates: evolution of the concept, evolution of the structure. *Brain Res Bull*. 57:463-469.
- Martínez-García F, Novejarque A, Landete JM, Moncho-Bogani J, Lanuza E. 2002b. Distribution of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the brain of the lizard *Podarcis hispanica*. *J Comp Neurol*. 447:99-113.
- Martínez-García F, Novejarque A, Lanuza E. 2007a. Evolution of the amygdala in vertebrates. En: editor Kaas JH. *Evolution of Nervous Systems*, Vol. 2. Oxford: Academic Pres. p 255-334
- Martínez-García F, Agustin-Pavon C, Martínez-Hernández J, Martínez-Ricós J, Moncho-Bogani J, Novejarque A and Lanuza E. 2007b. Have Sexual Pheromones Their Own Reward System in the Brain of

- Female Mice? En: editores Hurst JL, Beynon RE. Chemical Signals in Vertebrates XI. Heidelberg: Springer. En prensa.
- Martínez-Marcos A, Lanuza E, Font C, Martínez-García F. 1999a. Afferents to the red nucleus in the lizard *Podarcis hispanica*: putative pathways for visuomotor integration. *J Comp Neurol.* 411:35-55.
- Martínez-Marcos A, Lanuza E, Halpern M. 1999b. Organization of the ophidian amygdala: chemosensory pathways to the hypothalamus. *J Comp Neurol.* 412:51-68.
- Martínez-Marcos A, Úbeda-Bañón I, Lanuza E, Halpern M. 2005. Chemoarchitecture and afferent connections of the "olfactostriatum": a specialized vomeronasal structure within the basal ganglia of snakes. *J Chem Neuroanat.* 29:49-69.
- Martínez-Ricos J, Agustin-Pavón C, Lanuza E, Martínez-García F. 2007. Intraspecific communication through chemical signals in female mice: reinforcing properties of involatile male sexual pheromones. *Chem Senses.* 32:139-48.
- Maser JD, Klara JW, Gallup GG Jr. 1973. Archistriatal lesions enhance tonic immobility in the chicken (*Gallus gallus*). *Physiol Behav.* 11:729-733.
- McDonald AJ. 1991a. Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. *Neuroscience.* 44:1-14.
- McDonald AJ. 1991b. Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. *Neuroscience.* 44:15-33.
- McDonald AJ. 1998. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol.* 55:257-332.
- McDonald AJ, Shammah-Lagnado SJ, Shi C, Davis M. 1999. Cortical afferents to the extended amygdala. *Ann N Y Acad Sci.* 877:309-338.
- Medina L, Reiner A. 1994. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the pigeon brain. *J Comp Neurol.* 342:497-537.
- Medina L, Smeets WJAJ, Hoogland PV, Puelles L. 1993. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the brain of the lizard *Gallotia galloti*. *J Comp Neurol.* 331:261-285.
- Medina L, Legaz I, González G, De Castro F, Rubenstein JL, Puelles L. 2004. Expression of Dbx1, Neurogenin 2, Semaphorin 5A, Cadherin 8, and Emx1 distinguish ventral and lateral pallial histogenetic divisions in the developing mouse claustramygdaloid complex. *J Comp Neurol.* 474:504-523.
- Mello CV, Vates GE, Okuhata S, Nottebohm F. 1998. Descending auditory pathways in the adult male zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *J Comp Neurol.* 395:137-160.
- Meredith M, Fewell G. 2001. Vomeronasal organ: electrical stimulation activates Fos in mating pathways and in GnRH neurons. *Brain Res.* 922:87-94.
- Metzdorf R, Gahr M, Fusani L. 1999. Distribution of aromatase, estrogen receptor, and androgen receptor mRNA in the forebrain of songbirds and

- nonsongbirds. *J. Comp Neurol.* 407:115-129.
- Metzger M, Jiang S, Braun K. 1998. Organization of the dorsocaudal neostriatal complex: A retrograde and anterograde tracing study in the domestic chick with special emphasis on pathways relevant to imprinting. *J Comp Neurol.* 395:380-404.
- Mijnster MJ, Raimundo AG, Koskuba K, Klop H, Docter GJ, Groenewegen HJ, Voorn P. 1997. Regional and cellular distribution of serotonin 5-hydroxytryptamine<sub>2a</sub> receptor mRNA in the nucleus accumbens, olfactory tubercle, and caudate putamen of the rat. *J Comp Neurol.* 389:1-11.
- Miller LR, Gutzke WH. 1999. The role of the vomeronasal organ of crotalines (*Reptilia: Serpentes: Viperidae*) in predator detection. *Anim Behav.* 58:53-57.
- Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, Pear L, Wilkinson HA, Hayashi S, Pfaff DW, Ogawa S, Rohrer SP, Schaeffer JM, McEwen BS, Alves SE. 2003. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 144 :2055-2067.
- Moga MM, Geib BM, Zhou D, Prins GS. 2000. Androgen receptor-immunoreactivity in the forebrain of the Eastern Fence lizard (*Sceloporus undulatus*). *Brain Res.* 879:174-182.
- Mogensen J, Divac I. 1982. The prefrontal 'cortex' in the pigeon. Behavioral evidence. *Brain Behav Evol.* 21:60-66.
- Mogensen J, Divac I. 1993. Behavioural effects of ablation of the pigeon-equivalent of the mammalian prefrontal cortex. *Behav Brain Res.* 55:101-107.
- Mohedano-Moriano A, Pro-Sistiaga P, Ubeda-Banon I, Crespo C, Insausti R, Martínez-Marcos A. 2007. Segregated pathways to the vomeronasal amygdala: differential projections from the anterior and posterior divisions of the accessory olfactory bulb. *Eur J Neurosci.* 25:2065-2080.
- Moncho-Bogani J, Lanuza E, Hernández A, Novejarque A, Martínez-García F. 2002. Attractive properties of sexual pheromones in mice. Innate or learned? *Physiol Behav.* 77:167-176.
- Moncho-Bogani J, Martínez-García F, Novejarque A, Lanuza E. 2005. Attraction to sexual pheromones and associated odorants in female mice involves activation of the reward system and basolateral amygdala. *Eur J Neurosci.* 21:2186-2198.
- Moreno N, González A. 2003. Hodological characterization of the medial amygdala in anuran amphibians. *J Comp Neurol.* 466:389-408.
- Moreno N, González A. 2004. Localization and connectivity of the lateral amygdala in anuran amphibians. *J Comp Neurol.* 479:130-148.
- Moskowitz AK. 2004. "Scared stiff": catatonia as an evolutionary-based fear response. *Psychol Rev.* 111:984-1002.
- Murphy FA, Tucker K, Fadool DA. 2001. Sexual dimorphism and developmental expression of signal-transduction machinery in the vomeronasal organ. *J Comp Neurol.* 432:61-74.
- Myers EA, Rinaman L. 2005. Trimethylthiazoline supports conditioned

- flavor avoidance and activates viscerosensory, hypothalamic, and limbic circuits in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288:1716-1726.
- Naito A, Kita H. 1994. The cortico-pallidal projection in the rat: an anterograde tracing study with biotinylated dextran amine. *Brain Res.* 653:251-7
- Newman R, Winans SS. 1980. An Experimental Study of the Ventral Striatum of the Golden Hamster. II. Neuronal Connections of the olfactory Tubercle. *J Comp Neurol.* 191:193-212.
- Novejarque A, Lanuza E, Martínez-García F. 2004. Amygdalostriatal projections in reptiles: a tract-tracing study in the lizard *Podarcis hispanica*. *J Comp Neurol.* 479:287-308.
- Osborne Curwen A. 1939. The telencephalon of *Tupinambis nigropunctatus* III. Amygdala. *J Comp Neurol.* 71: 613-636.
- Osborn M, Weber K. 1982. Immunofluorescence and immunocytochemical procedures with affinity purified antibodies: tubulin-containing structures. *Methods Cell Biol.* 24:97-132.
- Packard MG, Teather LA. 1998. Amygdala modulation of multiple memory systems: hippocampus and caudate-putamen. *Neurobiol Learn Mem.* 69:163-203.
- Panzica GC, Aste N, Castagna C, Viglietti-Panzica C, Balthazart J. 2001. Steroid-induced plasticity in the sexually dimorphic vasotocinergic innervation of the avian brain: behavioral implications. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 37:178-200.
- Parent A. 1990. Extrinsic connections of the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 13:254-258.
- Parent A, Hazrati LN. 1993. Anatomical aspects of information processing in primate basal ganglia. *Trends Neurosci.* 16 :111-116.
- Parent A, Hazrati LN. 1995. Functional anatomy of the basal ganglia: I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 20: 91-127.
- Parkinson JA, Olmstead MC, Burns LH, Robbins TW, Everitt BJ. 1999. Dissociation in effects of lesions of the nucleus accumbens core and shell on appetitive pavlovian approach behavior and the potentiation of conditioned reinforcement and locomotor activity by D-amphetamine. *J Neurosci.* 19:2401-2411.
- Parkinson JA, Crofts HS, McGuigan M, Tomic DL, Everitt BJ, Roberts AC. 2001. The role of the primate amygdala in conditioned reinforcement. *J Neurosci.* 21:7770-7780.
- Paxinos G, Franklin KBJ. 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, segunda edición. San Diego: Academic Press.
- Pecina S, Cagniard B, Berridge KC, Aldridge JW, Zhuang X. 2003. Hyperdopaminergic mutant mice have higher "wanting" but not "liking" for sweet rewards. *J Neurosci.* 23:9395-9402.
- Pérez-Clausell J. 1988. Organization of zinc-containing terminal fields in the brain of the lizard *Podarcis hispanica*: a histochemical study. *J Comp Neurol.* 267:153-171.

- Pérez-Santana L, Marin O, Smeets WJAJ. 1997. Afferent connections of the nucleus accumbens of the snake, *Elaphe guttata*, studied by means of in vitro and in vivo tracing techniques in combination with TH immunocytochemistry. *Neurosci Lett.* 225:101-104.
- Petrovich GD, Swanson LW. 1997. Projections from the lateral part of the central amygdalar nucleus to the postulated fear conditioning circuit. *Brain Res.* 763:247-254.
- Petrovich GD, Risold PY, Swanson LW. 1996. Organization of projections from the basomedial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat. *J Comp Neurol.* 374:387-420.
- Pezzone MA, Lee W-S, Hoffman GE, Rabin BS. 1992. Induction of c-Fos immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli. *Brain Res.* 597:41-50.
- Pfaff D, Keiner M. 1973. Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J. Comp Neurol.* 151:121-158.
- Pfaus JG, Heeb MM. 1997. Implications of immediate-early gene induction in the brain following sexual stimulation of female and male rodents. *Brain Res Bull.* 44:397-407.
- Phillips RE. 1964. "Wildness" in the mallard duck: effects of brain lesions and stimulation on "escape behavior" and reproduction. *J Comp Neurol.* 122:139-155.
- Phillips RE, Youngren OM. 1986. Unilateral kainic acid lesions reveal dominance of right archistriatum in avian fear behavior. *Brain Res.* 377:216-220.
- Pitkänen A. 2000. Connectivity of the rat amygdaloid complex. En: editor Aggleton JP. *The Amygdala. A functional analysis.* Oxford: Oxford University Press. p 31-115.
- Pitkänen A, Amaral DG. 1998. Organization of the intrinsic connections of the monkey amygdaloid complex: projections originating in the lateral nucleus. *J Comp Neurol.* 398:431-458.
- Pitkänen A, Stefanacci L, Farb CR, Go GG, Ledoux JE, Amaral DG. 1995. Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the lateral nucleus. *J Comp Neurol.* 356:288-310.
- Pitkänen A, Savander V, Ledoux JE. 1997. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci.* 20:517-523.
- Pla R, Borrell V, Flames N, Marín O. 2006. Layer acquisition by cortical GABAergic interneurons is independent of Reelin signaling. *J Neurosci.* 26:6924-6934.
- Porrino LJ, Lyons D, Miller MD, Smith HR, Friedman DP, Daunais JB, Nader MA. 2002. Metabolic mapping of the effects of cocaine during the initial phases of self-administration in the nonhuman primate. *J Neurosci.* 22:7687-7694.
- Powers AS, Reiner A. 1993. The distribution of cholinergic neurons in the central nervous system of turtles. *Brain Behav Evol.* 41:326-345.

- Prado-Alcala R, Wise RA. 1984. Brain stimulation reward and dopamine terminal fields. I. Caudate-putamen, nucleus accumbens and amygdala. *Brain Res.* 297:265-273.
- Price JL, Russchen FT, Amaral DG. 1987. The limbic region. II: The amygdaloid complex. *Handbook of Chemical Neuroanatomy.* 5:279-388.
- Price JL, Slotnick BM, Revial MF. 1991. Olfactory projections to the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 306:447-461.
- Pritz MB. 1974a. Ascending connections of a midbrain auditory area in a crocodile, *Caiman crocodilus*. *J Comp Neurol.* 153:179-197.
- Pritz MB. 1974b. Ascending connections of a thalamic auditory area in a crocodile, *Caiman crocodilus*. *J Comp Neurol.* 153:199-213.
- Pritz MB. 1975. Anatomical identification of a telencephalic visual area in crocodiles: ascending connections of nucleus rotundus in *Caiman crocodilus*. *J Comp Neurol.* 164:323-338.
- Pritz MB, Stritzel ME. 1992. A second auditory area in the non-cortical telencephalon of a reptile. *Brain Res.* 569:146-151.
- Pritz MB, Stritzel ME. 1994. Anatomical identification of a telencephalic somatosensory area in a reptile, *Caiman crocodilus*. *Brain Behav Evol.* 43:107-127.
- Puelles L. 2001a. Brain segmentation and forebrain development in amniotes. *Brain Res Bull.* 55:695-710.
- Puelles L. 2001b. Thoughts on the development, structure and evolution of the mammalian and avian telencephalic pallium. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 356:1583-1598.
- Puelles L, Kuwana E, Puelles E, Rubenstein JL. Comparison of the mammalian and avian telencephalon from the perspective of gene expression data. 1999. *Eur J Morphol.* 37:139-150.
- Puelles L, Kuwana E, Puelles E, Bulfone A, Shimamura K, Keleher J, Smiga S, Rubenstein JL. 2000. Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J Comp Neurol.* 424:409-438.
- Ramón y Cajal, S. Estructura del septum lucidum. 1901. *Trabaj Lab Invest Biol.* 1:159-188.
- Redies C, Medina L, Puelles L. 2001. Cadherin expression by embryonic divisions and derived gray matter structures in the telencephalon of the chicken. *J. Comp Neurol.* 438:253-285.
- Reep RL, Cheatwood JL, Corwin JV. 2003. The associative striatum: organization of cortical projections to the dorsocentral striatum in rats. *J Comp Neurol.* 467:271-292.
- Regidor J, Poch L. 1988. Histochemical analysis of the lizard dorsal cortex: an acetylcholinesterase, cytochrome oxidase and NADPH-diaphorase study. En: editores Schwerdtfeger WK, Smeets WJAJ. *The Forebrain of Reptiles. Current concepts of structure and function.* Basel: Karger. p 77-84.
- Reiner A, Karten HJ. 1985. Comparison of olfactory bulb projections in pigeons and turtles. *Brain Behav Evol.* 27:11-27.

- Reiner A, Perkel DJ, Bruce LL, Butler AB, Csillag A, Kuenzel W, Medina L, Paxinos G, Shimizu T, Striedter G, Wild M, Ball GF, Durand S, Güntürkün O, Lee DW, Mello CV, Powers A, White SA, Hough G, Kubikova L, Smulders TV, Wada K, Dugas-Ford J, Husband S, Yamamoto K, Yu J, Siang C, Jarvis ED. 2004. Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. *J Comp Neurol.* 473:377-414.
- Reiner A, Yamamoto K, Karten HJ. 2005. Organization and evolution of the avian forebrain. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 287:1080-1102.
- Rhen T, Crews D. 2001. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA in the brain and reproductive tissues of the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *J. Comp. Neurol.* 437:385-397.
- Richard S, Martínez-García F, Lanuza E, Davies DC. 2004. Distribution of corticotropin-releasing factor-immunoreactive neurons in the central nervous system of the domestic chicken and Japanese quail. *J Comp Neurol.* 469:559-580.
- Riedel A, Hartig W, Seeger G, Gartner U, Brauer K, Arendt T. 2002. Principles of rat subcortical forebrain organization: a study using histological techniques and multiple fluorescence labeling. *J Chem Neuroanat.* 23:75-104.
- Robbins TW, Cador M, Taylor JR, Everitt BJ. 1989. Limbic-striatal interactions in reward-related processes. *Neurosci Biobehav Rev.* 13:155-162.
- Rogan MT, Leon KS, Perez DL, Kandel ER. 2005. Distinct neural signatures for safety and danger in the amygdala and striatum of the mouse. *Neuron.* 46:309-320.
- Roosendaal B, Koolhaas JM, Bohus B. 1990. Differential effect of lesioning of the central amygdala on the bradycardiac and behavioral response of the rat in relation to conditioned social and solitary stress. *Behav Brain Res.* 41:39-48.
- Rosen JB. 2004. The neurobiology of conditioned and unconditioned fear: a neurobehavioral system analysis of the amygdala. *Behav Cogn Neurosci Rev.* 3:23-41.
- Rosen JB, Fanselow MS, Young SL, Sitcoske M, Maren S. 1998. Immediate-early gene expression in the amygdala following footshock stress and contextual fear conditioning. *Brain Res.* 796:132-142.
- Rosen G, O'Bryant E, Matthews J, Zacharewski T, Wade J. 2002. Distribution of androgen receptor mRNA expression and immunoreactivity in the brain of the green anole lizard. *J. Neuroendocrinol.* 14:19-28.
- Russchen FT, Price JL. 1984. Amygdalo-striatal projections in the rat. Topographical organization and fiber morphology shown using the lectin PHA-L as an anterograde tracer. *Neurosci Lett.* 47:15-22.
- Russchen FT, Jonker AJ. 1988. Efferent connections of the striatum and the nucleus accumbens in the lizard *Gekko gekko*. *J Comp Neurol.* 276:61-80.
- Russchen FT, Bakst I, Amaral DG, Price JL. 1985. The amygdalo-striatal projections in the monkey. An anterograde tracing study. *Brain Res.* 329:241-257.
- Russchen FT, Smeets WJAJ, Hoogland PV. 1987. Histochemical identification of

- pallidal and striatal structures in the lizard *Gekko gecko*: evidence for compartmentalization. *J Comp Neurol.* 256:329-341.
- Salinas JA, White NM. 1998. Contributions of the hippocampus, amygdala, and dorsal striatum to the response elicited by reward reduction. *Behav Neurosci.* 112:812-826.
- Sanchez C. 2003. Stress-induced vocalisation in adult animals. A valid model of anxiety? *Eur J Pharmacol.* 463:133-143.
- Santiago AC, Shammah-Lagnado SJ. 2004. Efferent connections of the nucleus of the lateral olfactory tract in the rat. *J Comp Neurol.* 471:314-332.
- Sarter M, Bruno JP. The neglected constituent of the basal forebrain corticopetal projection system: GABAergic projections. 2002. *Eur J Neurosci.* 15:1867-1873.
- Savander V, Go CG, Ledoux JE, Pitkänen A. 1995. Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: Projections originating in the basal nucleus. *J Comp Neurol.* 361:345-368.
- Savander V, Go G-G, Ledoux JE, Pitkänen A. 1996. Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: Projections originating in the accessory basal nucleus. *J Comp Neurol.* 374:291-313.
- Scalia F, Winans SS. 1975. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol.* 161:31-55.
- Schofield BR, Cant NB. 1996. Origins and targets of commissural connections between the cochlear nuclei in guinea pigs. *J Comp Neurol.* 375:128-46.
- Schoenbaum G, Chiba AA, Gallagher M. 1999. Neural encoding in orbitofrontal cortex and basolateral amygdala during olfactory discrimination learning. *J Neurosci.* 19:1876-1884.
- Schultz W. 2004. Neural coding of basic reward terms of animal learning theory, game theory, microeconomics and behavioural ecology. *Curr Opin Neurobiol.* 14:139-147.
- Seifert U, Hartig W, Grosche J, Bruckner G, Riedel A, Brauer K. 1998. Axonal expression sites of tyrosine hydroxylase, calretinin- and calbindin-immunoreactivity in striato-pallidal and septal nuclei of the rat brain: a double-immunolabelling study. *Brain Res.* 795:227-246.
- Sellings LH, McQuade LE, Clarke PB. 2006. Characterization of dopamine-dependent rewarding and locomotor stimulant effects of intravenously-administered methylphenidate in rats. *Neuroscience.* 141:1457-1468.
- Shammah-Lagnado SJ, Santiago AC. 1999. Projections of the amygdalopiriform transition area (APir). A PHA-L study in the rat. *Ann N Y Acad Sci.* 877:665-660.
- Shammah-Lagnado SJ, Beltramino CA, McDonald AJ, Miselis RR, Yang M, De Olmos J, Heimer L, Alheid GF. 2000. Supracapsular bed nucleus of the stria terminalis contains central and medial extended amygdala elements: evidence from anterograde and retrograde tracing experiments in the rat. *J. Comp Neurol.* 422:533-555.
- Shimada S, Inagaki S, Kubota Y, Ogawa N, Shibasaki T, Takagi H. 1989. Coexistence

- of peptides (corticotropin releasing factor/neurotensin and substance P/somatostatin) in the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdaloid nucleus of the rat. *Neuroscience* 30:377-383.
- Shibley MT, Adamek GD. 1984. The connections of the mouse olfactory bulb: a study using orthograde and retrograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Brain Res Bull.* 12:669-688.
- Shibley MT, Ennis M, Puche A. 2004. Olfactory system. En: editor Paxinos G. *The Rat Nervous System*, tercera edición. San Diego. Academic press. p 923-964.
- Siemen M, Kunzle H. 1994. Connections of the basal telencephalic areas c and d in the turtle brain. *Anat Embryol.* 189:339-359.
- Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW. 1990. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp Neurol.* 294:76-95.
- Smeets WJ, Medina L. 1995. The efferent connections of the nucleus accumbens in the lizard *Gekko gekko*. A combined tract-tracing/transmitter-immunohistochemical study. *Anat Embryol (Berl).* 191:73-81.
- Smeets WJ, Hoogland PV, Voorn P. 1986. The distribution of dopamine immunoreactivity in the forebrain and midbrain of the lizard *Gekko gekko*: an immunohistochemical study with antibodies against dopamine. *J Comp Neurol.* 253, 46-60.
- Smeets WJ, Pérez-Clausell J, Geneser FA. 1989. The distribution of zinc in the forebrain and midbrain of the lizard *Gekko gekko*. A histochemical study. *Anat Embryol (Berl).* 180:45-56.
- Smeets WJ, Sevensma JJ, Jonker AJ. 1990. Comparative analysis of vasotocin-like immunoreactivity in the brain of the turtle *Pseudemys scripta elegans* and the snake *Python regius*. *Brain Behav. Evol.* 35:65-84.
- Smith-Fernández A, Pieau C, Reperant J, Boncinelli E, Wassef M. 1998. Expression of the Emx-1 and Dlx-1 homeobox genes define three molecularly distinct domains in the telencephalon of mouse, chick, turtle and frog embryos: implications for the evolution of telencephalic subdivisions in amniotes. *Development.* 125:2099-2111.
- Stein EA, Fuller SA. 1992. Selective effects of cocaine on regional cerebral blood flow in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 262:327-334.
- Sternberger LA. 1979. The unlabeled antibody peroxidase (PAP) method. En: editor Sternberger LA. *Inmunocytochemistry*. New York: Wiley & Sons. p 104-169.
- Stoll CJ, Voorn P. 1985. The distribution of hypothalamic and extrahypothalamic vasotocinergic cells and fibers in the brain of a lizard, *Gekko gekko*: presence of a sex difference. *J. Comp. Neurol.* 239:193-204.
- Stoll CJ, Voorn P. 1985. The distribution of hypothalamic and extrahypothalamic vasotocinergic cells and fibers in the brain of a lizard, *Gekko gekko*: presence of a sex difference. *J Comp Neurol.* 239:193-204.
- Stowers L, Holy TE, Meister M, Dulac C, Koentges G. 2002. Loss of sex discrimination and male-male aggression

- in mice deficient for TRP2. *Science*. 295:1493-1500.
- Striedter GF. 1997. The telencephalon of tetrapods in evolution. *Brain Behav Evol*. 49:179-213.
- Striedter GF, Beydler S. 1997. Distribution of radial glia in the developing telencephalon of chicks. *J. Comp. Neurol.* 387 :399-420.
- Striedter, GF, Marchant, TA, Beydler, S. 1998. The "neostriatum" develops as part of the lateral pallium in birds. *J. Neurosci.* 18:5839-5849.
- Swanson LW. 1987. The hypothalamus. En: editores Hokfelt T et al. *Integrated Systems of the CNS, Parte I, Vol. 5.* Amsterdam: Elsevier. p 1-124.
- Swanson LW, Cowan MW. 1975. A note on the connections and development of the nucleus accumbens. *Brain Res.* 92:324-330.
- Swanson LW, Petrovich GD. 1998. What is the amygdala? *Trends Neurosci.* 21:323-331.
- Swanson LW, Risold PY. 1999. On the basic architecture of the septal region. In: Numan R, editor. *The behavioral neuroscience of the septal region.* New York: Springer. p 1-14.
- Tang YZ, Piao YS, Zhuang LZ, Wang ZW. 2001. Expression of androgen receptor mRNA in the brain of *Gekko gekko*: implications for understanding the role of androgens in controlling auditory and vocal processes. *J. Comp Neurol.* 438:136-147.
- Thepen T, Voorn P, Stoll CJ, Sluiter AA, Pool CW, Lohman AHM. 1987. Mesotocin and vasotocin in the brain of the lizard *Gekko gekko*. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.* 250:649-656.
- Thompson RR, Goodson JL, Ruscio MG, Adkins-Regan E. 1998. Role of the archistriatal nucleus taeniae in the sexual behavior of male Japanese quail (*Coturnix japonica*): a comparison of function with the medial nucleus of the amygdala in mammals. *Brain Behav Evol.* 51:215-229.
- Tomarev SI, Callaerts P, Kos L, Zinovieva R, Halder G, Gehring W, Piatigorsky J. Squid Pax-6 and eye development. 1997. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:2421-2426.
- Ulinski PS. 1978. Structure of anterior dorsal ventricular ridge in snakes. *J Morph.* 148:1-22.
- Ulinski PS. 1983. Dorsal Ventricular Ridge. A Treatise on Forebrain Organization in Reptiles and Birds. New York: John Wiley & Sons.
- Veenman CL, Wild JM, Reiner A. 1995. Organization of the avian corticostriatal projection system: a retrograde and anterograde pathway tracing study in pigeons. *J Comp Neurol.* 354:87-126.
- von Campenhausen H, Mori K. 2000. Convergence of segregated pheromonal pathways from the accessory olfactory bulb to the cortex in the mouse. *Eur J Neurosci.* 12:33-46.
- Voneida TJ, Sligar CM. 1979. Efferent projections of the dorsal ventricular ridge and the striatum in the tegu lizard, *Tupinambis nigropunctatus*. *J Comp Neurol.* 186:43-64.
- Walker DL, Toufexis DJ, Davis M. 2003. Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *Eur J Pharmacol.* 463:199-216.
- Wang Z, Bullock NA, DE Vries GJ. 1993. Sexual differentiation of vasopressin projections

- of the bed nucleus of the stria terminalis and medial amygdaloid nucleus in rats. *Endocrinology* 132:2299-2306.
- Warembourg M. 1977. Metabolism of steroids in the central nervous system and pituitary of various mammals. *Ann. Endocrinol.* 38:41-54.
- Watson JT, Adkins-Regan E. 1989. Neuroanatomical localization of sex steroid-concentrating cells in the Japanese quail (*Coturnix japonica*): autoradiography with [3H]-testosterone, [3H]-estradiol, and [3H]-dihydrotestosterone. *Neuroendocrinology* 49:51-64.
- Wersinger SR, Baum MJ. 1996. The temporal pattern of mating-induced immediate-early gene product immunoreactivity in LHRH and non-LHRH neurons of the estrous ferret forebrain. *J Neuroendocrinol.* 8:345-359.
- Whetstone KN, Martin LD. 1979. New look at the origin of birds and crocodiles. *Nature.* 279: 234-236.
- White NM, McDonald RJ. 2002. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem.* 77:125-184.
- Wild JM. 1987. The avian somatosensory system: connections of regions of body representation in the forebrain of the pigeon. *Brain Res.* 412:205-223.
- Wild JM, Karten HJ, Frost BJ. 1993. Connections of the auditory forebrain in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol.* 337:32-62.
- Wild JM, Arends JJ, Zeigler HP. 1990. Projections of the parabrachial nucleus in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol.* 293:499-523.
- Wright CI, Beijer AVJ, Groenewegen HJ. 1996. Basal amygdaloid complex afferents to the rat nucleus accumbens are compartmentally organized. *J Neurosci.* 16:1877-1893.
- Wysocki CJ, Wellington JL, Beauchamp GK. 1980. Access of urinary nonvolatiles to the mammalian vomeronasal organ. *Science.* 207:781-783.
- Wysocki CJ, Nyby J, Whitney G, Beauchamp GK, Katz Y. 1982. The vomeronasal organ: primary role in mouse chemosensory gender recognition. *Physiol Behav.* 29:315-327.
- Yasui Y, Saper CB, Cechetto DF. 1991. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactive projections from the thalamus to the striatum and amygdala in the rat. *J. Comp. Neurol.* 293:293-310.
- Young LJ, Lopreato GF, Horan K, Crews D. 1994. Cloning and in situ hybridization analysis of estrogen receptor, progesterone receptor, and androgen receptor expression in the brain of whiptail lizards (*Cnemidophorus uniparens* and *C. inornatus*). *J. Comp. Neurol.* 347:288-300.
- Zaborszky L, Pang K, Somogyi J, Nadasdy Z, Kallo I. 1999. The basal forebrain corticopetal system revisited. *Ann N Y Acad Sci.* 877:339-367.
- Zahm DS. 1998. Is the caudomedial shell of the nucleus accumbens part of the extended amygdala? A consideration of connections. *Crit Rev Neurobiol.* 12:245-265.
- Zahm DS. 1999. Functional-anatomical implications of the nucleus accumbens core and shell subterritories. *Ann N Y Acad Sci.* 877:113-128.

Zahm DS, Heimer L. 1987. The ventral striatopallidothalamic projection. III. Striatal cells of the olfactory tubercle establish direct synaptic contact with ventral pallidal cells projecting to mediodorsal thalamus. *Brain Res.* 404:327-331.

Zeier H, Karten HJ. 1971. The archistriatum of the pigeon: organization of afferent and efferent connections. *Brain Res.* 31:313-326.