



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**REGULACIÓN DEL NÚCLEO ACCUMBENS, A TRAVÉS DEL  
SISTEMA DE ENDOCANABINOIDES, EN EL CONDICIONAMIENTO  
DE MIEDO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA

**RODRIGO PEDROZA LLINÁS**

DIRECTOR DE TESIS

**DR. ÓSCAR PROSPÉRO GARCÍA**

FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR

**DRA. ANA MARÍA LÓPEZ COLOMÉ**  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR  
**DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ**  
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

MÉXICO, D.F., AGOSTO DE 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**

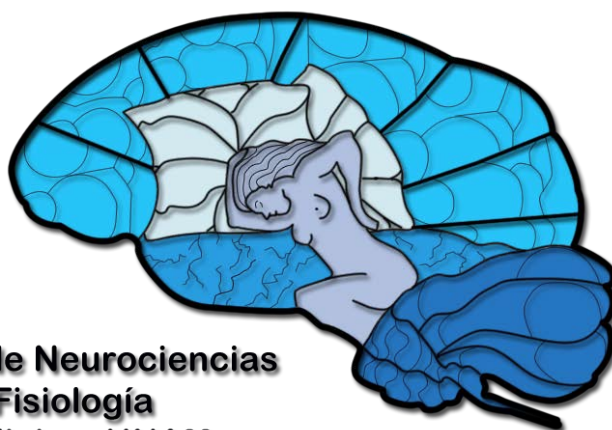


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

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

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

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



**Grupo de Neurociencias  
Fisiología  
Medicina, UNAM**

Esta tesis se desarrolló teórica y experimentalmente en el Laboratorio de Canabinoides, del Grupo de Neurociencias, en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la supervisión del Dr. Óscar Próspero García.

Durante el desarrollo de esta tesis conté con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a través de la beca número 132563 que para la realización de mis estudios de doctorado me fue otorgada. Asimismo, los resultados de esta investigación fueron presentados en congresos científicos gracias al apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, y al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

Asimismo, las investigaciones realizadas para esta tesis contaron con el financiamiento de los apoyos DGAPA IN208010 y CONACyT 199103 otorgados al Dr. Óscar Próspero.

---

---

Resumen	5
Abreviaturas	6
1. Introducción. Miedo y condicionamiento de miedo	7
1.1 El miedo como herramienta para contender con el peligro	7
1.2 La adaptación de las respuestas de miedo por medio del aprendizaje	8
1.3. Miedo condicionado y condicionamiento del miedo	9
1.4. Neurobiología del miedo condicionado	12
1.4.1. La amígdala	13
1.4.2. El hipocampo	15
2. El núcleo accumbens	17
2.5. Núcleo accumbens y miedo condicionado	21
3. Sistema endocanabinérgico.	23
3.1. Los endocanabinoides	24
3.1.2. Anandamida	24
3.1.3. 2-araquidonilglicerol	25
3.2. Los receptores a cannabinoides	27
3.2.1. Receptor CB1	27
3.2.2. Receptor CB2	30
3.3. Endocanabinoides y miedo condicionado.	31
3.3. Sistema endocanabinérgico en el NAc	33
4. Planteamiento del problema	36
5. Hipótesis	36
6. Objetivos	37
7. Métodos	39
7.1. Sujetos	39
7.2. Cirugía	39
7.3. Fármacos y administración	40
7.4. Aparatos	41
7.5. Procedimientos conductuales	42
7.6. Histología	44
7.7. Análisis estadístico	46

---

---

8. Resultados	47
8.1. La activación del receptor CB1 en el NAcC antes del entrenamiento impide la adquisición de miedo condicionado al contexto	49
8.2. La activación del receptor CB1 en el NAcC antes del entrenamiento no bloquea la adquisición del miedo condicionado a una señal auditiva	50
8.3. El bloqueo del receptor CB1 revierte la interferencia canabinérgica sobre la adquisición del miedo condicionado a un contexto	52
8.4. La activación del receptor CB1 en el NAcS no impide la adquisición del miedo condicionado al contexto	53
8.5. La activación del receptor CB1 en el NAcC después del entrenamiento no afecta la adquisición del miedo condicionado al contexto	54
8.6. La administración de glutamato revierte los efectos de AEA en el NAcC.	55
9. Discusión.	56
9.1. El miedo generado por el condicionamiento, y otras cuestiones conductuales	56
9.2. Las dosis y el efecto farmacológico de AEA en el condicionamiento contextual	58
9.3. El momento en el cual la AEA interfiere con el condicionamiento contextual	61
9.4. La subregión del NAc que participa en el condicionamiento contextual	64
9.5. Condicionamiento al contexto contra condicionamiento a la señal auditiva	67
9.6. El efecto de la coadministración de glutamato con AEA	69
9.7. El NAc como codificador de contextos, y el sistema endocanabinérgico como modulador de dicha codificación	73
9.7.1. La relación NAc-hipocampo	74
9.8. Conclusiones	77
10. Referencias	78

## Resumen

- El miedo condicionado a un contexto es un aprendizaje a través del cual los animales identifican que en un sitio específico corren peligro. Para que un animal aprenda que un lugar es peligroso, precisa que ciertas estructuras de su cerebro trabajen coordinadamente; entre estas estructuras, destacan la amígdala y el hipocampo.
- En íntima comunicación anatómica y funcional con la amígdala y el hipocampo, el **núcleo accumbens (NAc)** es una estructura telencefálica importante también para el aprendizaje del miedo condicionado. La evidencia sugiere, particularmente, que el núcleo accumbens core (NAcC) es necesario para el aprendizaje del miedo condicionado a un contexto.
- De los diversos sistemas neuroquímicos presentes en el NAcC, se sabe que la activación del **sistema endocanabinérgico** inhibe el aprendizaje del miedo condicionado a un contexto. Como dicho sistema endocanabinérgico está presente en el NAcC, y ejerce una modulación sobre la excitabilidad de dicha estructura, en este trabajo se planteó la hipótesis de que **existe una regulación endocanabinérgica en el NAcC sobre el aprendizaje del miedo condicionado a un contexto.**
- Para comprobar esta hipótesis se administró un agonista canabinérgico (anandamida, AEA) en el NAcC del cerebro de ratas **antes** o **después** del aprendizaje del condicionamiento del miedo contextual. Sólo la administración del fármaco antes del aprendizaje interfirió con el aprendizaje.
- Dicha interferencia endocanabinérgica con el miedo contextual pudo ser revertida cuando se administró AEA junto con un antagonista específico del receptor CB1, o junto con glutamato.
- Las administraciones hechas después del entrenamiento, o antes del condicionamiento del miedo a una señal auditiva no tuvieron efectos significativos. La activación farmacológica del sistema endocanabinérgico en el núcleo accumbens shell (NAcS) tampoco tuvo efectos significativos.
- Los resultados obtenidos apuntan a que el NAcC forma parte de un circuito necesario para la codificación de contextos espaciales. Dicha función sería dependiente de la comunicación con el hipocampo, y podría ser regulada por la actividad del receptor CB1.

## Abreviaturas

<b>2-AG:</b> 2-araquidonilglicerol	<b>NACc:</b> núcleo accumbens core
<b>AEA:</b> anandamida	<b>NACs:</b> núcleo accumbens shell
<b>AMI:</b> amígdala	<b>NAT:</b> N-aciltransferasa
<b>ATV:</b> área tegmental ventral	<b>NEp:</b> núcleo entopeduncular
<b>BLA:</b> complejo basolateral de la amígdala	<b>NSL:</b> núcleo septal lateral
<b>CA:</b> comisura anterior	<b>NT:</b> neurotransmisor
<b>CAC:</b> corteza anterior del cíngulo	<b>NOS:</b> óxido nítrico sintasa
<b>CB1:</b> receptor a cannabinoides 1	<b>PalV:</b> pálido ventral
<b>CB2:</b> receptor a cannabinoides 2	<b>PCP:</b> fenciclidina
<b>CPF:</b> corteza prefrontal; -m: medial	<b>PESpC:</b> potencial excitador postsináptico de campo
<b>CeA:</b> amígdala central	<b>PLD:</b> fosfolipasa D
<b>DAG:</b> diacil glicerol	<b>RC:</b> respuesta condicionada
<b>DSE:</b> supresión de la excitación inducida por despolarización	<b>RI:</b> respuesta incondicionada
<b>DSI:</b> supresión de la inhibición inducida por despolarización	<b>SNC:</b> <i>substancia nigra pars compacta</i>
<b>ERK:</b> proteína cinasa regulada por señales extracelulares	<b>SNR:</b> <i>substancia nigra pars reticulata</i> ; -dm: dorsomedial
<b>Estr:</b> estriado	<b>TAL:</b> tálamo; -IL: región infralímbica, -PV: paraventricular
<b>GIRK:</b> canales rectificadores de potasio dependientes de proteínas G	<b>THC:</b> $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol
<b>GP:</b> globo pálido; -i: interno	<b>TO:</b> tubérculo olfatorio
<b>HIP:</b> hipocampo	<b>TRPV1:</b> receptor de potencial transitorio V1
<b>HL:</b> hipotálamo lateral	<b>WIN-2:</b> WIN 55,212-2
<b>EC:</b> estímulo condicionado	
<b>EI:</b> estímulo incondicionado	
<b>EN:</b> estímulo neutro	
<b>FAAH:</b> hidrolasa de los ácidos grasos amidados	
<b>Mesenc caud:</b> mesencéfalo caudal	
<b>MAGL:</b> monoacil glicerol lipasa	
<b>MAPK:</b> proteína cinasa activada por mitógenos	
<b>NAC:</b> núcleo accumbens	

## 1. Introducción. Miedo y condicionamiento de miedo

### 1.1 El miedo como herramienta para contender con el peligro

Todos los animales se han de enfrentar con situaciones peligrosas en algún momento de sus vidas, situaciones en las que la falla para hacerle frente a esos peligros puede suponer un daño, o incluso la muerte. Para contender exitosamente con los peligros del ambiente la evolución ha forjado una respuesta compleja que llamamos miedo. Este miedo puede ser definido como un conjunto de **respuestas fisiológicas** y **respuestas conductuales** (también llamadas conductas defensivas, o simplemente 'conductas' en lo sucesivo) para hacerle frente a situaciones peligrosas y potencialmente mortales (Bolles, 1970; LeDoux, 2000; Mineka & Öhman, 2002; Orsini & Maren, 2012).

En relación con las respuestas fisiológicas de miedo, éstas son principalmente respuestas producidas por el Sistema Nervioso Autónomo. Se consideran como respuestas fisiológicas de miedo taquicardia, dilatación de pupilas, elevación de la presión arterial, aumento en la frecuencia respiratoria, defecación, micción, incremento en la liberación de hormonas de estrés (p.ej., corticosterona), e hipoalgesia (Lang, Davis & Öhman, 2000; LeDoux, 2000).

En relación con las conductas de miedo, éstas varían de especie a especie, pero suelen reducirse a huida, congelamiento ("freezing") o conductas defensivas (Bolles, 1970). La selección de una conducta en particular (de todas las que innatamente puede utilizar el animal para enfrentarse al peligro) se realiza en función de la probabilidad que tiene esa conducta seleccionada de contender exitosamente con el peligro particular al que se le hace frente. Por ejemplo, una rata que recibe descargas eléctricas en una caja cerrada huirá (p. ej., saltando o corriendo) si dicha caja tiene escape; si no se encuentra una salida disponible, la rata se congelará (Blanchard & Blanchard, 1969, 1972; Blanchard, Fukunaga & Blanchard, 1976). Es importante



destacar que estas conductas, una vez que se presentan, son signo confiable de miedo (Maren, 2008), por lo que su presencia y magnitud permiten inferir tanto que un animal está experimentando miedo, así como la intensidad de ese miedo.

Finalmente, es importante mencionar que las respuestas de miedo se presentan frente a estímulos que parecen haber estado relacionados con situaciones peligrosas recurrentes en la historia evolutiva (Mineka & Öhman, 2002). Esto implica que, aunque algunos estímulos son innatamente capaces de generar la respuesta de miedo, otros estímulos del ambiente requieren un proceso de aprendizaje para llegar a tener el control sobre la aparición del miedo (Mineka & Öhman, 2002). En otras palabras, el individuo puede adaptarse más eficientemente a su ambiente si aprende a reconocer peligros nuevos, y a desplegar sus respuestas de miedo en forma apropiada.

## 1.2 La adaptación de las respuestas de miedo por medio del aprendizaje

Las respuestas de miedo se dan, de forma innata, frente a estímulos que durante miles o millones de años han estado asociados recurrentemente a la aparición de un peligro (p. ej., el olor de un predador; Bolles, 1970; Mineka & Öhman, 2002). Sin embargo, el individuo se encuentra en su medio con peligros nuevos, peligros que la evolución no le ha capacitado para reconocer sin haberlos experimentado previamente. Si el sujeto encuentra una amenaza novedosa en su ambiente y logra sobrevivir a ella, el sujeto aprende a reconocer e identificar a la amenaza por algún estímulo característico de dicha amenaza (y aprende también a reconocer el lugar donde experimentó esa amenaza). Es decir, ciertos estímulos o contextos que antes no generaban ninguna respuesta de miedo ahora adquirirán la capacidad de predecir peligro, y generarán en consecuencia las respuestas de miedo. Se trata de un proceso de aprendizaje, en el cual estímulos originalmente neutros se asocian con un daño, dando como consecuencia miedo (LeDoux, 1996;

Maren, 2001; Maren, 2011; Johansen, Cain, Ostroff & LeDoux, 2011). Al miedo adquirido a través del aprendizaje se le llama **miedo condicionado** (para diferenciarlo del miedo innato), y se estudia a través de un modelo experimental conocido como **condicionamiento del miedo**.

### 1.3. Miedo condicionado y condicionamiento del miedo

El condicionamiento del miedo es un modelo de laboratorio para estudiar al miedo condicionado. Dicho miedo condicionado es un aprendizaje asociativo de tipo pavloviano (LeDoux, 1996; Maren, 2001; Orsini & Maren, 2012). En un condicionamiento pavloviano, un estímulo originalmente neutro (EN) para una respuesta de interés (R) adquiere la capacidad de generar a esa misma R. Para lograrlo, el EN debe ser asociado con otro estímulo (“estímulo incondicionado”, EI) que innatamente sí es capaz de producir a R. Cuando la R es generada por el EI, ésta lleva el nombre de “respuesta incondicionada” (RI). Después de varias asociaciones, el EN adquiere la capacidad de generar a la RI aún en ausencia del EI. En este caso, el EN se convierte en “estímulo condicionado” (EC) y la RI se convierte en “respuesta condicionada” (RC) (Pavlov, 1927). El ejemplo clásico de este tipo de aprendizaje es el trabajo de Ivan Pavlov en perros, el cual puede ser revisado con gran detalle en Pavlov, 1927.

Un ejemplo (importante desde una perspectiva histórica) que ilustra la naturaleza pavloviana del miedo condicionado se puede encontrar en el famoso reporte de John B. Watson y Rosalie Rayner sobre “Little Albert” (Watson & Rayner, 1920; Maren, 2001). Watson y Rayner (1920) trabajaron con un niño de once meses de edad, “Albert B.”, a quien le permitieron interactuar con una rata blanca de laboratorio (EN). Cada vez que el niño se aproximaba a la rata, Watson y Rayner golpeaban con un martillo una barra de acero suspendida sobre el niño, produciendo un fuerte ruido (EI). El ruido de la barra provocaba en Albert B. llanto, el cual se

interpretó como miedo (RI). En ocasiones posteriores, cada vez que la rata (EC) era puesta en proximidad a Albert B., él lloraba e intentaba alejarse la mayor distancia que le era posible de la rata; ambas conductas se interpretan como miedo (RC) (Watson & Rayner, 1920). Dejando de lado las implicaciones éticas de este experimento, el reporte de Watson y Rayner ilustra cómo un individuo aprende a reconocer amenazas del ambiente y a actuar en consecuencia (mostrando miedo).

Los elementos importantes del aprendizaje del miedo condicionado, ejemplificados en el reporte de Watson y Rayner (1920), fueron sistematizados por Estes y Skinner (1941) en un procedimiento estándar de condicionamiento del miedo. Estes y Skinner (1941) introdujeron ratas hambrientas en una cámara operante, en la cual las entrenaron para presionar una palanca por comida. Posteriormente, estas ratas fueron repetidamente expuestas (en esta misma cámara operante) a tonos de 3 minutos de duración, los cuales terminaban con la aplicación de una descarga eléctrica a través del piso de la cámara. Después de varias de estas asociaciones, la aparición del tono tuvo como consecuencia una disminución significativa en la tasa de palanqueo (Estes & Skinner, 1941). A esta reducción en la respuesta de palanqueo se le llamó “supresión condicionada”, y fue interpretada como un signo confiable de miedo dado que un animal hambriento, en una situación de peligro, prefiere defenderse que saciar su hambre (Stein & Brady, 1958; Ray & Stein, 1959).

En estudios más recientes, el procedimiento habitual para producir miedo condicionado es una variación del protocolo de Estes y Skinner (1941). En este procedimiento se introduce a un animal (frecuentemente roedores) en una caja cerrada, cuyo piso se compone de una rejilla metálica. Dentro de esta caja se hace presente un estímulo discreto (generalmente es un tono auditivo, llamado “señal”, aunque también se pueden emplear luces u olores). Acompañando a

este tono, o algunos segundos después de que termina ese tono (Rescorla, 1988; Fanselow, 1994) se hace pasar una descarga eléctrica por el piso de la caja (Figura 1, A). Estas asociaciones se repiten varias veces (aunque se ha reportado que una sola asociación es suficiente para generar miedo condicionado) (Kalish 1954). Cuando el animal es expuesto nuevamente al tono se observan respuestas de miedo en ausencia de descargas eléctricas (Figura 1, B). A este tipo de condicionamiento del miedo se le llama **condicionamiento del miedo a una señal auditiva**.

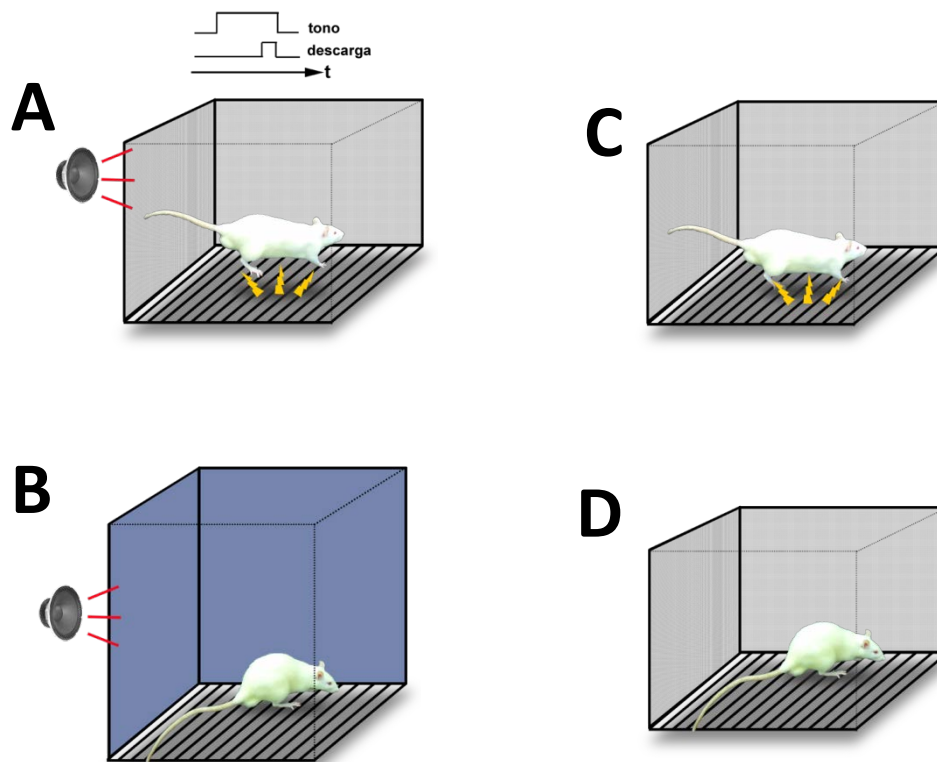
La “supresión condicionada” de Estes y Skinner no es ya una forma habitual de cuantificar la intensidad del miedo condicionado; en su lugar, se prefiere medir directamente respuestas de miedo (p. ej., micción, defecación, frecuencia cardiaca, vocalizaciones ultrasónicas, temperatura corporal; LeDoux, 1996; Antoniadis & McDonald, 1999). La respuesta más frecuentemente evaluada y reportada es la conducta de **congelamiento** (LeDoux, 1996; Maren, 2008). El congelamiento se define como el cese de todo movimiento, incluido el de las vibrisas, excepto por aquellos propios de la respiración (Fanselow, 2000). Sin ser una RI a las descargas eléctricas (la RI a las descargas eléctricas es un breve pero significativo aumento en la locomoción; Fanselow, 1982), el congelamiento se constituye como un indicador confiable de miedo condicionado, y su magnitud (es decir, el tiempo que pasa un animal congelado) se interpreta como un índice de la intensidad del miedo experimentado (Fanselow, 1980, 1982; Maren, 2008).

Si el animal entrenado a temerle a señales auditivas es expuesto a la caja donde fue entrenado, aunque se omitan las señales auditivas se podrá observar que este animal experimenta miedo condicionado (se congela). Esto quiere decir que el contexto<sup>1</sup> mismo (la caja experimental) ha adquirido la capacidad de predecir la aparición de las descargas. A este tipo de condicionamiento se le llama **condicionamiento del miedo a un contexto** (o sólo

---

<sup>1</sup> Se puede entender por contexto, conceptualmente, a un conjunto de elementos constitutivos, independientes y concurrentes, que pueden ser potencialmente percibidos por un sujeto (Rudy, 2009), o como el fondo externo, ambiental, constituido por lugares, configuraciones de objetos y características de esos lugares, en el cual suceden los procesos cognitivos (Maren, Phan & Liberzon, 2013).

“condicionamiento contextual”), y se logra habitualmente exponiendo a un animal a un contexto en el que sólo recibe descargas eléctricas (Figura 1, C). Posteriormente es expuesto de nuevo al contexto de entrenamiento, y en ausencia de descargas eléctricas este animal se congela (Figura 1, D).



**Figura 1**

**Procedimiento para generar miedo condicionado.** A y B, fases de entrenamiento en el condicionamiento de miedo a una señal auditiva y sólo a un contexto, respectivamente. En el recuadro superior de A se esquematiza la relación temporal que tienen las señales y las descargas. C, la evaluación del miedo condicionado en el condicionamiento a una señal se realiza en un contexto distinto al del entrenamiento para minimizar la exhibición de miedo condicionado al contexto. D, evaluación del miedo condicionado al contexto.

#### 1.4. Neurobiología del miedo condicionado

Existen numerosos estudios que han arrojado luz sobre los circuitos neurales fundamentales para el miedo condicionado (para una revisión, ver Orsini & Maren, 2012). Es uno de los propósitos de la presente argumentación mostrar que el núcleo accumbens (NAc) es una

estructura importante para dicho aprendizaje. Sin embargo, resulta pertinente revisar primero a otras dos estructuras límbicas de gran relevancia para el miedo condicionado. Estas estructuras son la amígdala y el hipocampo. Al NAc se le revisará con más detalle al final de esta sección.

#### **1.4.1. La amígdala**

La amígdala es una estructura localizada en el seno del lóbulo temporal. Fue descrita por vez primera en el siglo XIX por Karl Friederich Burdach (Meyer, 1970), quien le confirió el nombre de “amígdala” a un cúmulo de células cuya distribución le recordó a Burdach la forma de una almendra (amígdala se deriva del griego, y quiere decir almendra) (Davis, Rainnie & Cassell, 1994; Sah, Faber, Lopez de Armentia & Power, 2003; LeDoux, 2007). Se encuentra dentro del lóbulo temporal rostral (Martin, 1998), y se compone de varias poblaciones neuronales (Sah et al., 2003), que pueden ser agrupados en

- a) **Amígdala basolateral (o complejo basolateral, BLA),**
- b) **Núcleos corticales,**
- c) **Amígdala central (o centromedial, CeA),**
- d) **Otros núcleos amigdalinos,** específicamente el área anterior de la amígdala y el área amígdalohipocampal.

También existe un grupo de neuronas, las células intercaladas, que facilitan el flujo de información entre la CeA y la BLA (Price, Russchen & Amaral, 1987; Sah et al., 2003).

La hipótesis de que la amígdala podría ser importante para las respuestas de miedo ganó fundamento cuando, en 1937, Heinrich Klüver y Paul Bucy removieron los lóbulos temporales de un mono Rhesus, encontrando que la lesión produjo en el mono que éste dejara de exhibir

reacciones de miedo y enojo, principalmente (Klüver & Bucy, 1937). Estos síntomas, que Klüver y Bucy llamaron “ceguera psíquica”, se conocen hoy como *síndrome de Klüver y Bucy*.

Años después, en 1956, Weiskrantz encontró que, de todas las estructuras que forman al lóbulo temporal, las lesiones en la amígdala son suficientes para provocar síntomas semejantes al síndrome de Klüver & Bucy (Weiskrantz, 1956). Estudios como el de Weiskrantz permiten inferir que la amígdala es una estructura necesaria para la generación de miedo.

En relación con el miedo condicionado, la lesión de la amígdala de ratas incrementa la latencia de estos animales para mostrar supresión condicionada ante una señal auditiva asociada con descargas eléctricas (Kellcutt & Schwartzbaum, 1963). También, la lesión de la amígdala incrementa la latencia para escapar de un compartimiento en el cual se han recibido tonos acompañados de descargas eléctricas (Golstein, 1965). Existe asimismo evidencia de que la amígdala es esencial para aprender que un contexto es peligroso (p. ej., Blanchard & Blanchard, 1972).

Por lo tanto, estos datos sugieren que la amígdala es una estructura cerebral esencial para mostrar respuestas de miedo, ya sea innato o aprendido. Es la amígdala, entonces, el “centro del miedo” del cerebro. Este centro del miedo permite la generación innata de las respuestas de miedo frente a ciertos estímulos, así como la asociación de las respuestas de miedo con estímulos que la experiencia enseña que son predictores de peligro. Es decir, como centro del miedo, amígdala controla el miedo innato y el miedo aprendido (condicionado).

Otra estructura cerebral importante para el miedo condicionado, en especial para el miedo condicionado a un contexto, es el hipocampo.

### 1.4.2. El hipocampo

La formación hipocampal es una estructura subcortical, límbica, que se halla en el lóbulo temporal, medial a la fisura rinal, caudal a la amígdala, y ocupando la región medial del piso del cuerno temporal del ventrículo lateral (López-Antúnez, 1979; Swanson, Köhler & Björklund, 1987; Martin, 1998, DeFelipe, Fernández-Gil, Kastanauskaite, Palacios Bote, Gañán Presmanes & Trinidad Ruiz, 2007). Su apariencia gruesa semeja la forma de un caballito de mar (de ahí el nombre “hipocampo”; DeFelipe et al., 2007). El hipocampo es dividido comúnmente en cuatro componentes principales:

- a) **Área entorrinal,**
- b) **Complejo subicular (o subículo),**
- c) **Cuerpo hipocampal,**
- d) **Giro dentado.**

Las conexiones entre todas estas subestructuras siguen un patrón muy bien definido, mismo que ha sido detallado tanto anatómica como funcionalmente (ver, por ejemplo, Andersen, Bliss & Skrede, 1970; Witter, 1989).

Desde el reporte hecho por Scoville y Milner (1957) del paciente H.M. es ampliamente reconocido que el hipocampo es clave para la codificación de la memoria declarativa (Scoville & Milner, 1957; para una revisión, ver Kandel & Squire, 2009). También hay abundante evidencia de que el hipocampo es necesario para la orientación y la memoria espaciales (O’Keefe & Dostrovsky, 1971; Moser, Kropff & Moser, 2008). Es por esta función espacial del hipocampo que se cree que la representación neural de contexto depende también del hipocampo (Rudy, 2009).



En relación con la función del hipocampo en el miedo condicionado a un contexto, Phillips y LeDoux (1992) encontraron que la lesión del hipocampo en ratas impide la asociación contexto-descargas, pero no la asociación tonos-descargas. Maren y Fanselow (1997) obtuvieron resultados similares, lesionando regiones relacionadas con el hipocampo (la fimbria y la corteza entorrinal), o lesionando al hipocampo mismo. En otro estudio, más reciente, Liu et al. (2012) marcaron neuronas activas durante el aprendizaje del condicionamiento del miedo contextual. La reactivación optogenética de dichas células hipocámpales generó respuestas de miedo (congelamiento) en los ratones entrenados, efecto que no se observó con la activación de células hipocámpales no activas durante el aprendizaje (Liu et al., 2012; Reijmers, Perkins, Matsuo & Mayford, 2012).

En resumen, la evidencia del párrafo anterior apunta a que el hipocampo es una estructura importante para el miedo condicionado a un contexto, pero que no es esencial para el miedo condicionado a una señal auditiva.

De la información presentada en esta sección se puede concluir que existe en el cerebro un “sistema de miedo”, compuesto por varias estructuras. En este sistema, la amígdala es el “núcleo” del sistema, pues es quien recibe la información sensorial de áreas como el hipocampo (contextos), la corteza auditiva o el tálamo (señales auditivas); asocia esta información (principal, aunque no exclusivamente, por la BLA) y manda la instrucción, a través de la CeA, para que otras estructuras subcorticales expresen las respuestas de miedo (p. ej., la sustancia gris periacueductual para la generación de respuestas defensivas; el núcleo parabraquial para producir taquicardia; el núcleo reticular del puente caudal para la potenciación de reflejos; el hipotálamo lateral para el incremento de frecuencia cardíaca y de presión arterial; el núcleo motor dorsal del vago para la micción/defecación, etc.) (Hamilton, Ellenberger, Liskowsky & Schneiderman, 1981;

Krieger & Graeff, 1985; Bandler, Depaulis & Vergnes, 1985; LeDoux, Iwata, Cicchetti & Reis, 1988; Davis et al., 1994; Yeomans & Frankland, 1995; Petrovich & Swanson, 1997; Orsini & Maren, 2012).

Sin embargo, también existe evidencia que muestra que, en este sistema de miedo, se puede incluir a otra estructura límbica: el núcleo accumbens. El núcleo accumbens es una estructura del cerebro basal anterior tradicionalmente relacionada con motivación/recompensa. Cada vez más reportes aportan evidencia de que esta región cerebral es parte del sistema de miedo. En las siguientes secciones se revisa la anatomía y función del núcleo accumbens, y su relación con el miedo condicionado.

## 2. El núcleo accumbens

El **núcleo accumbens** (NAc) es una estructura que forma parte del telencéfalo de los mamíferos. En el cerebro humano se ubica en la parte caudal del asta anterior del ventrículo lateral, y arriba de la sustancia perforada anterior (López-Antúnez, 1979). En 1907 Ariëns Kappers y Theunissen consideraron al NAc como una extensión filogenéticamente antigua de la cabeza del putamen, y le dieron el nombre *nucleus accumbens septi* (“núcleo apoyado sobre el septum”) (Swanson & Cowan, 1975). Se considera al NAc, junto con el tubérculo olfatorio y la porción ventromedial del caudado y el putamen, como parte del **estriado ventral** (el estriado ventral son aquellas regiones estriatales que no reciben aferencias corticales) (Prensa, Richard & Parent, 2003). El NAc es el componente más importante del estriado ventral (Figura 2, A) (Prensa et al., 2003).

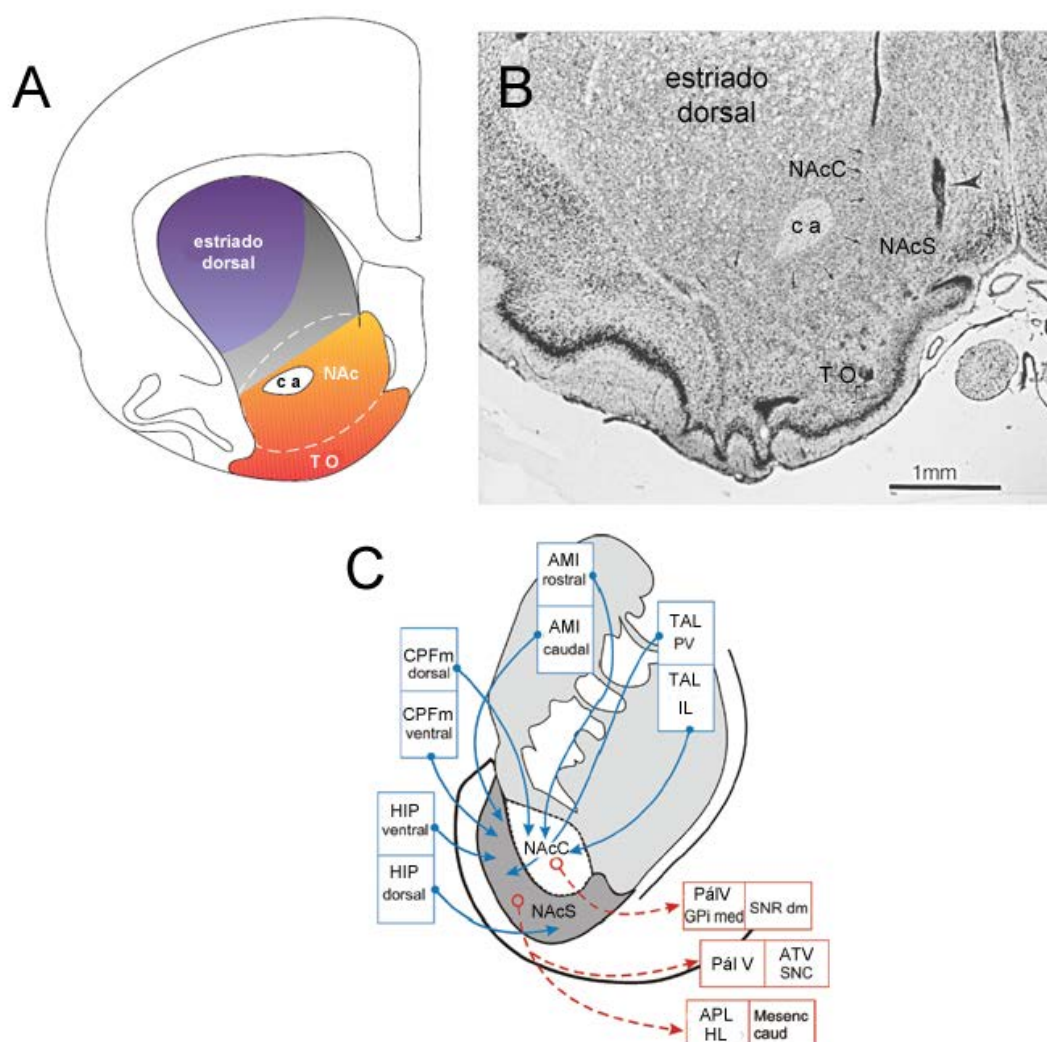
Como en el resto del cuerpo estriado, las neuronas principales del NAc son neuronas espinosas medianas, constituyendo más del 90% de la estructura (Kawaguchi, Wilson, Augood & Emson, 1995).

Con base en criterios neuroquímicos (p. ej., inmunoreactividad a calbindina  $D_{28K}$ ) y en su patrón de aferencias y eferencias, el NAc se divide dos subregiones: el **núcleo accumbens shell** (NAcS) y el **núcleo accumbens core** (NAcC) (Figura 2, B) (Groenewegen, Wright, Beijer & Voorn, 1999). Se conservan los nombres en inglés en esta tesis por no existir una traducción al español generalmente aceptada de los nombres de estas subestructuras.

El NAcC es la parte más lateral y dorsal de la estructura. El NAcC envía proyecciones al pálido ventral; a la parte media del globo pálido interno; y a la parte dorsomedial de la *substancia nigra pars reticulata* (Groenewegen et al., 1999; Groenewegen, 2007). A su vez, el NAc recibe aferencias GABAérgicas del pálido ventral; dopaminérgicas del área ventral tegmental y de la parte medial de la *substancia nigra pars compacta*; y serotoninérgicas del núcleo del rafé dorsal (Groenewegen et al., 1999; Groenewegen, 2007).

Por otra parte, el NAcS es la parte más ventral y medial del NAc. El NAcS envía sus axones a regiones basales como las zonas ventral y dorsal del pálido ventral; a regiones hipotalámicas como el área preóptica y el hipotálamo lateral; y a regiones mesencefálicas como el área ventral tegmental y la *sustancia nigra pars compacta* (ver Figura 2.1, C) (Groenewegen et al., 1999; Groenewegen, 2007). A su vez, el NAcS recibe proyecciones de la corteza prefrontal medial, el núcleo talámico paraventricular; del hipocampo y de la amígdala (Figura 2, C) (Groenewegen, 2007).

Funcionalmente, la diferencia shell-core está en buena medida basada tanto con el patrón de aferencias y eferencias, como con las diferencias neuroquímicas mencionadas brevemente en los párrafos anteriores. Mogenson, Jones y Yim (1980) proponían que debido a que el NAcS tiene mejor conectividad con estructuras límbicas, y el NAcC tiene mejor conectividad con estructuras motoras, el NAc en conjunto debía ser una interfase entre la motivación y la acción; es decir, que los estados motivacionales debían poner en marcha la conducta apropiada gracias a que el sistema límbico se comunica con el sistema motor a través del NAc (Mogenson et al., 1980).



**Figura 2**

En esta figura se han omitido las aferencias monoaminérgicas. A modificada de Voorn, Vanderschuren, Groenewegen, Robbins & Pennartz, 2004; B modificada de Groenewegen et al., 1999; C modificada de Groenewegen, 2007.

Existe evidencia que apoya la relación NAcS-recompensa. Como ejemplo:

- Cuando una rata prueba por primera vez un sabor apetitoso (chocolate), se incrementa la liberación de dopamina en el NAcS; esta liberación no se observa cuando prueba un sabor aversivo (quinina o solución salina concentrada; Bassareo, De Luca & Di Chiara, 2002).
- Está reportado que las ratas responden con alta frecuencia (respuestas de palanqueo en una cámara operante) cuando cada respuesta es reforzada con administraciones en el NAcS de PCP, MK-801, nomifensina y cocaína; estas respuestas presentan una frecuencia significativamente menor cuando las administraciones se hacen en el NAcC (Carlezon, Mendrek & Wise, 1995).

Por otro lado, también existe evidencia que relaciona al NAcC con conductas de naturaleza más motora que motivacional; por ejemplo:

- La administración de un antagonista de los receptores NMDA en el NAcC, pero no en el NAcS, producen una disminución significativa en la conducta exploratoria, y en la actividad locomotora en general, en ratas (Maldonado-Irizarry & Kelly, 1994; Meredith, Baldo, Andrezjewski & Kelley, 2008).
- El incremento en la actividad motora producido por el tratamiento crónico con cocaína en ratas disminuye significativamente con la administración en el NAcC, pero no en el NAcS, de un antagonista glutamatérgico (Pulvirenti, Berrier, Kreifeldt & Koob, 1994).

- La liberación de dopamina en el NAcC es significativamente mayor que en el NAcS justo antes de que una rata emita una respuesta motora (palanqueo) para la obtención de un reforzador (Phillips, Stuber, Heien, Wightman & Carelli, 2003).

Por lo tanto, las dos subregiones que componen al NAc desempeñan funciones cognitivas distintas, aunque estrechamente relacionadas. De las líneas anteriores se podría suponer que el NAc es una estructura que debería tener relación con el miedo, y que alguna de las subregiones del NAc debería estar más relacionada con el miedo que la otra subregión, preferentemente el NAcS. Lo anterior, debido a que las aferencias de las estructuras límbicas involucradas con el miedo de las que se habló previamente (amígdala e hipocampo) son más profusas hacia el NAcS, y a que esta subregión tiene una función motivacional demostrada. Sin embargo, la relación entre el NAc y el miedo no parece seguir estrictamente esta suposición. Este tema se tratará a continuación.

## 2.5. Núcleo accumbens y miedo condicionado

Existen varios trabajos que han explorado la relación que guarda el NAc y el miedo condicionado. Por ejemplo,

- Riedel, Harrington, Hall y Macphail (1997) lesionaron el NAc antes de entrenar a los animales en un protocolo de condicionamiento de miedo a un tono (Riedel et al., 1997). Este experimento mostró que los animales lesionados presentaron significativamente menos congelamiento durante la ausencia del tono en comparación con los animales no lesionados. Tampoco se encontraron diferencias en la conducta de ambos grupos durante la presencia del tono (Riedel et al., 1997).

- Haralambous y Westbrook (1999) administraron un anestésico (bupivacaína) en el NAcC antes del entrenamiento del condicionamiento del miedo a una señal auditiva, o en el condicionamiento del miedo a un contexto. Posteriormente, a todos los animales (independientemente del condicionamiento en el que fueron entrenados) se les expuso a las señales auditivas y al contexto de entrenamiento. Sólo aquellos animales tratados con el fármaco, y que fueron condicionados al contexto, mostraron significativamente menos congelamiento al contexto (Haralambous & Westbrook, 1999).
- Levita, Dalley y Robbins (2002) lesionaron el NAcC de ratas antes o después del entrenamiento en el condicionamiento del miedo a un contexto o a una señal auditiva (Levita et al., 2002). Estos autores reportaron que las lesiones (antes o después del entrenamiento) disminuyeron significativamente el congelamiento de los animales durante la prueba de memoria (Levita et al., 2002).
- McDannald y Galarce (2011) lesionaron el NAcC de ratas que fueron días después entrenadas en el condicionamiento del miedo a una señal auditiva. Dichas manipulaciones no tuvieron ningún efecto ni en el congelamiento, ni en la supresión condicionada (McDannald & Galarce, 2011).

De estos estudios se desprende una importante conclusión: que la ausencia del NAc interfiere con el aprendizaje del miedo condicionado a un contexto, pero no a una señal auditiva. Este efecto se debe, en principio, a la ausencia del NAcC (siendo la supuesta participación del NAcS en el miedo condicionado poco clara).

En relación con los sistemas neuroquímicos que sustentan este aprendizaje en el NAc, la mayor parte de la investigación publicada está centrada en el papel del sistema dopaminérgico (por ser el NAc una de las estructuras cerebrales clave del sistema dopaminérgico mesolímbico de

la motivación). Así, se sabe por ejemplo que la liberación de dopamina en el NAc es mayor cuando se presentan estímulos discretos (tonos) que se han pareado con descargas eléctricas, mientras que la liberación de dopamina es mayor en el NAc cuando los animales son expuestos al mismo contexto en el cual recibieron descargas eléctricas (Pezze, Heidbreder, Feldon & Murphy, 2001). En contraste, otro estudio reciente indica que la presentación de una señal asociada con descargas incrementa la liberación de dopamina en el NAcS, mientras que dicha liberación se ve disminuida en el NAc frente al mismo estímulo (Badrinarayan et al., 2012).

Cualquiera que sea la modulación dopaminérgica del NAc en el miedo condicionado, lo cierto es que son muy pocos los sistemas neuroquímicos explorados en el NAc en relación con el miedo aprendido. Otro sistema neuroquímico, presente en el NAc, que podría estar regulando al miedo condicionado, es el sistema endocanabinérgico. El sistema endocanabinérgico es el responsable de los efectos psicotrópicos del consumo de marihuana. Se encuentra presente en el NAc, modula su excitabilidad, y se sabe que inhibe el aprendizaje del miedo condicionado a un contexto. Todos estos puntos se detallan en las secciones siguientes. Primero se detalla al sistema endocanabinérgico, después se describe su relación con el miedo condicionado, y al final de esta introducción se explica cuáles son las consecuencias de que dicho sistema neuroquímico esté expresado en el NAc.

### **3. Sistema endocanabinérgico.**

El sistema endocanabinérgico es un sistema neuroquímico, mejor conocido por ser el responsable de los efectos producidos por el consumo de la marihuana (de ahí el nombre de “canabinérgico”).

Apenas en 1940 se descubrió el principio activo de la marihuana, el  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC); en 1964 se identificó la estructura de este compuesto (Méndez-Díaz, Herrera-Solís, Soria-



Gómez, Rueda-Orozco & Prospéro-García, 2008), y hasta 1990 se logró clonar al primer receptor activado por el THC (el **receptor a cannabinoides 1**, o **CB1**; Pertwee, 2005). Se conocen ligandos endógenos, de naturaleza lipídica, que activan a este receptor (llamados **endocannabinoides**), así como enzimas responsables de sintetizar y degradar a estos ligandos. Los elementos anteriormente citados (endocannabinoides, receptor, y enzimas de síntesis y degradación) constituyen al sistema endocanabinérgico (Piomelli, 2003; Méndez-Díaz et al., 2008). En los siguientes párrafos se describen brevemente los componentes del sistema endocanabinérgico.

### 3.1. Los endocannabinoides

Los primeros “cannabinoides” descritos fueron compuestos naturalmente presentes en la cannabis (Pertwee, 2005). Se conocen cerca de 66 de estos compuestos (Méndez-Díaz et al., 2008). Gracias al estudio de estos cannabinoides vegetales (o fitocannabinoides) se sabe que cualquier sustancia considerada como canabinérgica ha de producir al menos cuatro efectos biológicos: a) **analgesia**, b) **hipotermia**, c) **cataplejia**, y d) **hipoactividad** (Svíženská, Dubový & Šulcová, 2008). El THC es el mejor ejemplo de sustancia canabinérgica de origen no endógeno. Sin embargo, han sido descubiertos varios endocannabinoides. Estos endocannabinoides tienen la propiedad de ser moléculas lipídicas, entre las cuales se cuentan amidas, ésteres, y éteres de ácidos grasos de cadenas largas polinsaturadas (Battista, Di Tommaso, Bari & Maccarrone, 2012). Los dos endocannabinoides mejor estudiados, y también los primeros descubiertos, son anandamida y 2-araquidonilglicerol (2-AG).

#### *3.1.2. Anandamida*

En 1992, a partir de extractos de cerebro de cerdo, Devane et al. (1992) aislaron un compuesto, la N-araquidoniletanolamina (ácido araquidónico unido a etanolamina), que demostró

tener propiedades canabinérgicas (Devane et al., 1992; Di Marzo, De Petrocellis & Bisogno, 2005). Llamaron a esta nueva molécula “anandamida” (AEA), nombre derivado de la palabra sánscrita “ananda” que significa “bendición” (Devane et al., 1992). En el cerebro, este endocanabinoide se encuentra en grandes cantidades en el tallo cerebral, hipocampo, estriado y médula, mientras que en el cerebelo, diencéfalo, y corteza se encuentra en menor cantidad (Bisogno et al., 1999). Se sabe que este compuesto es un agonista del receptor CB1 (Devane et al., 1992), aunque también se ha encontrado que es un agonista del receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1; Smart et al., 2000; Ross, 2003). Se sintetiza a partir de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina en reacciones sucesivas de transacilación (por la enzima N-aciltransferasa, o NAT) e hidrólisis (por la enzima fosfolipasa D, o PLD). La AEA es degradada principalmente por una enzima llamada hidrolasa de los ácidos grasos amidados (FAAH, de “Fatty-Acid Amide Hidrolase”; Basavarajappa, 2007). La acción de esta enzima da lugar a etanolamina y ácido araquidónico (Basavarajappa, 2007).

### *3.1.3. 2-araquidonilglicerol*

Mechoulam et al. (1995) aislaron del intestino canino otro compuesto que también demostró tener propiedades canabinérgicas: el 2-araquidonilglicerol (2-AG; Mechoulam et al., 1995). El 2-AG se expresa en mayormente en el tallo cerebral, estriado, hipocampo, y cerebro basal anterior en general (Bisogno et al., 1999). Se sintetiza a partir del segundo mensajero diacilglicerol (DAG), el cual pierde (por la acción de la enzima DAG-lipasa) un residuo de ácido graso de la posición 1 del glicerol, conservando ácido araquidónico en la posición 2 (van der Stelt et al., 2008). La degradación de 2-AG es realizada por la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL), quien separa el ácido araquidónico del glicerol. Sin embargo, también está reportado que el 2-AG puede ser degradado por la misma FAAH (Placzek, Okamoto, Ueda & Barker, 2008).

Aunque AEA y 2-AG son los endocannabinoides mejor conocidos, se conoce la existencia de otras moléculas que son consideradas endocannabinoides. Entre estos compuestos están noladin éter (o 2-araquidonilgliceril éter) (Hanuš et al., 2001), virodhamina (u O-araquidoniletanolamina) (Porter et al., 2002), oleamida (o *cis*-9, 10-octadecenamida) (Cravatt et al., 1995; Leggett et al., 2004), y N-araquidonil-dopamina (Huang et al., 2002; Méndez-Díaz et al., 2008).

Con respecto a la síntesis y liberación de los endocannabinoides, tanto AEA como 2-AG son lípidos, por lo que no pueden ser almacenados en vesículas. Su síntesis incrementa significativamente con el aumento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ . Estos dos eventos sugieren que la síntesis y liberación de endocannabinoides se produce “en demanda” (Piomelli, 2003; Alger & Kim, 2011). La síntesis se da en respuesta a la estimulación sináptica, y se ha comprobado que es rápida (a temperaturas fisiológicas, la síntesis de endocannabinoides comienza alrededor de 50 ms después de la estimulación sináptica; Heinbockel et al., 2005).

En segundo lugar, siendo lípidos, los endocannabinoides no deberían necesitar mecanismos de transporte para ser liberados. Sin embargo, hay evidencia de que sí existen mecanismos de transporte (ver, p. ej., Hillard, Edgemon, Jarrahian & Campbell, 1997 y Ligresti et al., 2004). A pesar de que dichos mecanismos aún no han sido del todo identificados, ya existen algunas proteínas candidatas a desempeñar dicha función transportadora; p. ej., una variante catalíticamente inactiva de la FAAH, llamada transportador de anandamida parecido a FAAH, o FLAT (por “FAAH-Like Anandamide Transporter”; Fu et al., 2012).

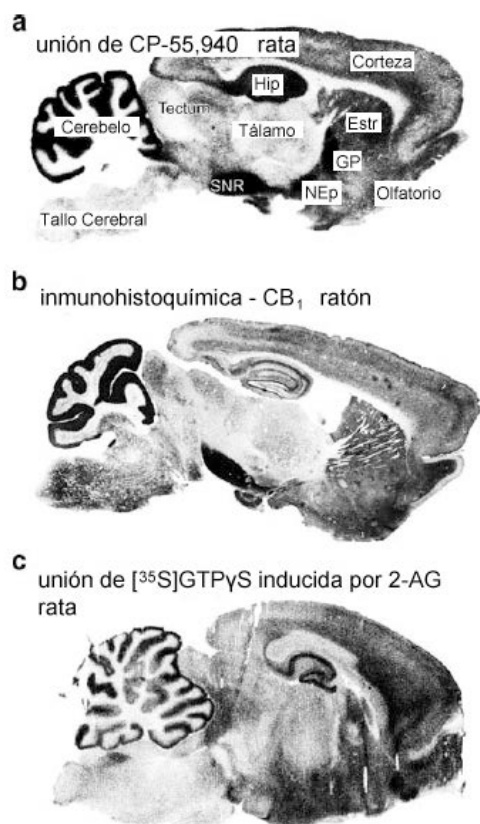
Una vez sintetizados y liberados, los endocannabinoides viajan de forma retrógrada, y activan a los receptores a cannabinoides, quienes suelen ser presinápticos. Se mencionó ya la

existencia del CB1, pero también se conoce un receptor adicional, el receptor a cannabinoides 2 (CB2). Estos receptores se describen a continuación.

## 3.2. Los receptores a cannabinoides

### 3.2.1. Receptor CB1

El CB1 fue identificado por Devane, Dysarz, Johnson, Melvin y Howlett (1988) en el cerebro de la rata. Poco tiempo después se logró clonar y caracterizar a dicho receptor (Matsuda, Lolait, Brownstein, Young & Bonner, 1990; Console-Bram, Marcu & Abood, 2012).



**Figura 3**

#### Métodos:

a. Autorradiografía empleando el agonista radioactivo CP-55, 940.

b. Inmunohistoquímica contra el receptor CB1.

c. Autorradiografía, usando un inhibidor (metil-araquidonilfluorofosfonato) de la degradación de 2-AG, lo que facilita la acumulación y detección de GTPγS radioactivo.

**Abreviaturas:** Hip: hipocampo; SNR: *sustancia nigra pars reticulata*; Estr: estriado; GP: globo pálido; NEp: núcleo entopeduncular.

Modificado de Katona, 2009.

El CB1 se encuentra de forma abundante en el cerebro, siendo considerado el receptor metabotrópico más abundante en este órgano (aunque puede hallarse en otros órganos, pero no con semejante abundancia) (Mechoulam & Parker, 2012). En la Figura 3 se muestra la expresión del CB1 en el cerebro, mediante diferentes métodos de detección. EL CB1 se concentra en las cortezas cerebral y cerebelosa, en el hipocampo, así como en núcleos de la base como estriado (incluyendo al NAc, revisado más adelante), globo pálido, núcleo entopeduncular (globo pálido interno en el primate), y la *sustancia nigra pars reticulata* (Herkenham et al., 1990; Herkenham, Lynn, de Costa & Richfield, 1991a; Herkenham et al., 1991b; Katona, 2009). Este receptor se expresa en prácticamente todos los tipos de neuronas estudiados (Mechoulam & Parker, 2012). Como ya se mencionó, receptores los CB1 se expresan en las terminales axónicas; es decir, son receptores presinápticos (Lovinger, 2008; Katona, 2009).

El CB1 es un receptor de siete dominios transmembranales, acoplado a proteínas  $G_{i/o}$ . Por tanto, uno de los efectos de su activación es la inhibición de adenilato ciclasa (isoformas 5 y 6) (Matsuda et al., 1990; Howlett, Reggio, Childers, Hampson, Ulloa & Deutsch, 2011). El CB1 activa también a las cinasas activadas por mitógenos (MAPK's) ERK1 y ERK2 (Piomelli, 2003; Demuth & Molleman, 2006; Howlett et al., 2011). Otro efecto conocido de la activación del CB1 es la síntesis de óxido nítrico (Howlett et al., 2011).

En cuanto a la regulación sináptica del CB1, es fundamental destacar que este receptor **inhibe la liberación de neurotransmisor**; este efecto está descrito **principalmente en terminales glutamatérgicas y GABAérgicas**, aunque también se ha encontrado en terminales colinérgicas y noradrenérgicas (Lovinger, 2008). El mecanismo a través del cual el CB1 inhibe la liberación de neurotransmisores es la regulación de canales iónicos. Es decir, la activación del CB1 inhibe canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje tipos N (que favorecen la movilización de las vesículas

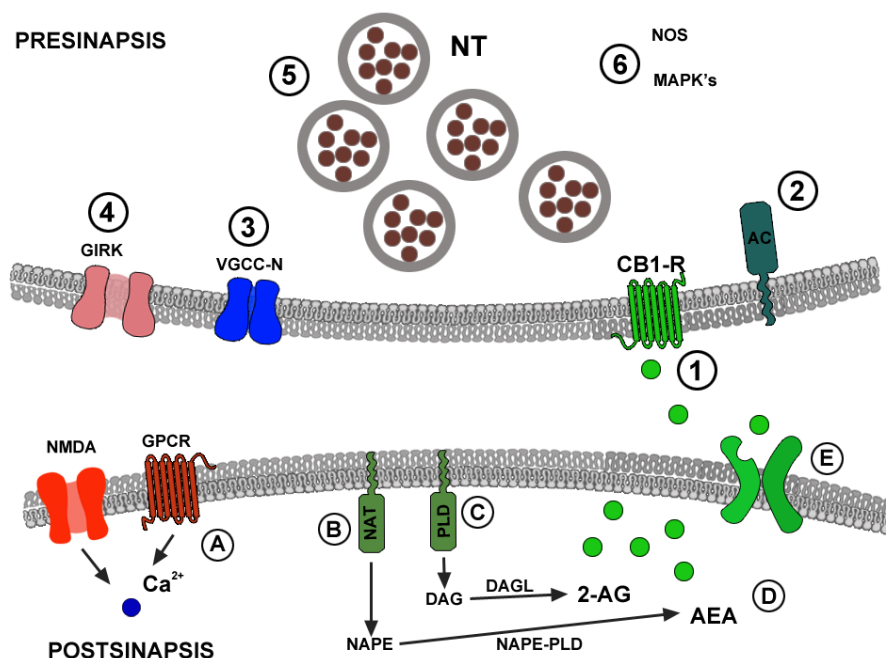
sinápticas a los sitios activos de liberación), y P/Q (Piomelli, 2003; Demuth & Moleman, 2006). El CB1 también facilita la apertura de canales rectificadores de potasio dependientes de proteínas G (GIRK's), lo cual hiperpolariza la terminal (Demuth & Moleman, 2006). En la Figura 4 se esquematizan los eventos antes mencionados.

Ahora bien, cuando la sinapsis inhibida es de naturaleza excitadora (glutamatérgica, por ejemplo), se habla de **supresión de la excitación inducida por despolarización (DSE)**, mientras que cuando la sinapsis inhibida es inhibitoria (GABAérgica, por ejemplo) se habla de **supresión de la inhibición inducida por despolarización (DSI)**, (Piomelli, 2003; Lovinger, 2008; Katona, 2009). Por lo tanto, en el caso de la DSE el efecto neto de la activación del CB1 será inhibitorio, mientras que en el caso de la DSI el efecto de la activación del CB1 será excitador (o, al menos, permisivo). Tanto la DSI como la DSE se producen alrededor de 400 ms después de la estimulación sináptica (Heinbockel et al., 2005).

## Figura 4

**EVENTOS PRESINÁPTICOS:** **A**, entrada de calcio en la postsinapsis como consecuencia de la actividad sináptica. **B** y **C**, activación de las enzimas de síntesis de anandamida y 2-AG, respectivamente. **D**, endocannabinoides sintetizados. **E**, liberación facilitada de endocannabinoides.

**EVENTOS POSTSINÁPTICOS:** **1**. Unión de los endocannabinoides al CB1. **2**, inhibición de adenilato ciclasa. **3**, cierre de canales d calcio. **4**, apertura de GIRK's. **5**. Menor movilización de vesículas a sitios activos de liberación. **6**, otros eventos intracelulares (p. ej., activación de MAPK's, y síntesis de óxido nítrico (NOS: óxido nítrico síntasa).



### 3.2.2. Receptor CB2

Un segundo receptor a cannabinoides fue identificado por Munro, Thomas y Abu-Shaar (1993): el CB2 (Munro et al., 1993; Console-Bram et al., 2012). Las vías de transducción de este receptor parecen ser las mismas que las del CB1 (Munro et al., 1993; Cluny, Reimer & Sharkey, 2012); sin embargo, hay diferencias importantes entre ambas proteínas.

En primer lugar, el CB2 se expresa principalmente en tejidos periféricos, particularmente en el sistema inmune (Munro et al., 1993; Mechoulam & Parker, 2012). Su expresión en el cerebro es muy escasa (Atwood & Mackie, 2010), y en cualquier caso menor a la expresión del CB1 (Mechoulam & Parker, 2012). No obstante, se ha logrado detectar al CB2 en microglía, células granulares cerebelosas, y en la retina (Svíženská et al., 2008).

En segundo lugar, no se ha observado que la activación del CB2-R produzca los efectos psicoactivos que genera la activación del CB1 (Hanusš et al., 1999; Mechoulam & Parker, 2012).

En tercer lugar, las afinidades de los dos endocannabinoides más estudiados y mejor conocidos (AEA y 2-AG) son menores para el CB2 que para el CB1. Así, la afinidad de AEA para estos receptores son: para el CB1 de  $52 \pm 1.8$  nM (Devane et al., 1992), mientras que para el CB2 de  $543 \pm 83$  nM (Felder, Briley, Axelrod, Simpson, Mackie & Devane, 1993). En el caso de 2-AG, la afinidad para el CB1 es  $472 \pm 55$ , mientras que para el CB2 es  $1400 \pm 172$  nM (Mechoulam et al., 1995). Debido a su escasa distribución en el cerebro, a la menor afinidad que los dos ligandos endógenos mejor conocidos tienen por esta proteína, y a su falta de efectos psicoactivos

semejantes a los producidos por la activación del CB1, el CB2 no fue considerado para el trabajo experimental de esta tesis, y no será discutido en lo sucesivo.

A modo de resumen, se pueden destacar varios puntos importantes del sistema endocannabinérgico:

- a) Los endocannabinoides son moléculas lipídicas, que son producidas y liberadas *en demanda* como consecuencia de la estimulación sináptica.
- b) Los endocannabinoides son mensajeros retrógrados, uniéndose a su receptor en la presinapsis.
- c) La activación de los receptores a endocannabinoides produce una disminución en la probabilidad de liberación de neurotransmisores. Esto puede llevar, funcionalmente, a una inhibición o excitación de la sinapsis modulada.

Los puntos más importantes de esta sección son representados en la Figura 4.

### 3.3. Endocannabinoides y miedo condicionado.

Las propiedades ansiolíticas del uso de la marihuana se conocen desde hace mucho tiempo, milenios quizá (Musty, 2005). Experimentalmente, este efecto ansiolítico se ha demostrado en roedores, empleando tareas que se usan en estos animales para evaluar ansiedad (p. ej., laberinto elevado en forma de más, o campo abierto) (Musty, 2005). Sin embargo, el papel del sistema endocannabinérgico ya no sólo como inductor de ansiólisis, sino como modulador de la memoria de miedo comenzó a explorarse en fechas relativamente recientes. Específicamente, Marsicano et al. (2002) generaron ratones “knock-out” al CB1. Dichos ratones fueron entrenados en un protocolo de condicionamiento de miedo a una señal auditiva, después de lo cual estos autores observaron que la falta de CB1 provocaba que los animales fueran ineficientes para



extinguir la tarea. Este efecto conductual fue imitado por administraciones sucesivas de un antagonista del CB1 en ratones silvestres (Marsicano et al., 2002).

El trabajo de Marsicano et al. (2002) inició una gran cantidad de investigación sobre el papel del sistema endocannabinérgico en la extinción del miedo condicionado (para una revisión detallada, ver Riebe, Pamplona, Kamprath & Wotjak, 2012). No obstante, el papel del sistema endocannabinérgico en el aprendizaje del miedo condicionado ha sido menos explorado. Para los fines de esta tesis conviene enfocar la atención en el papel del sistema endocannabinérgico en el aprendizaje del miedo condicionado a un contexto. Al respecto, se sabe que:

- La activación del receptor CB1 interfiere con el desempeño de animales experimentales en tareas dependientes del hipocampo (Akirav, 2011).
- Más específicamente, la administración sistémica de un agonista sintético del CB1 receptor (WIN-55,212-2), 15 minutos antes del entrenamiento en el condicionamiento del miedo a un contexto, produce significativamente menos congelamiento en animales tratados con las dosis más altas (2.5 y 5 mg/kg), en comparación con los animales tratados con las dosis más bajas (0.25 y 1.25 mg/kg), o con los controles (Pamplona & Takahashi, 2006).
- En nuestro laboratorio hemos observado que la administración del endocanabinoide oleamida en el hipocampo inmediatamente antes del entrenamiento en el condicionamiento del miedo a un contexto interfiere con el aprendizaje de la tarea, al medirse un día después del entrenamiento (Rueda-Orozco, observaciones no publicadas).

Los trabajos antes mencionados proveen evidencia que indica que la activación del receptor CB1 interfiere con el aprendizaje del miedo condicionado a un contexto.

Finalmente, conviene saber si dicho sistema endocannabinérgico está presente en la estructura de nuestro interés, que es el NAc. Este tema se revisa a continuación.

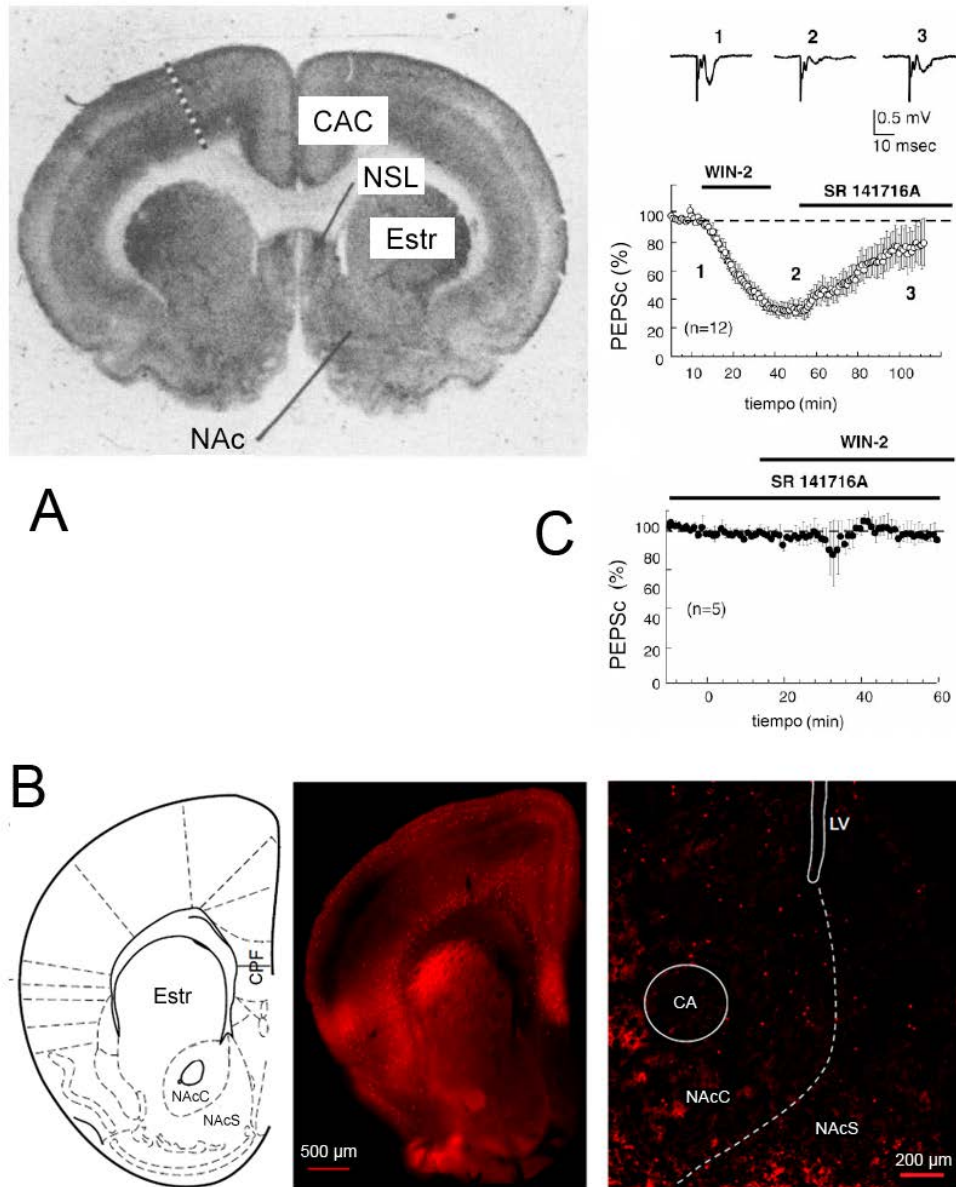
### 3.3. Sistema endocannabinérgico en el NAc

Desde los estudios de localización hechos en los años 90's se sabe que el CB1 está densamente expresado en los núcleos de la base, incluyendo al cuerpo estriado y, consecuentemente, en el NAc (por ejemplo, mediante la detección inmunohistológica del CB1, como se observa en la Figura 5, A; Herkenham et al., 1990, 1991a, b). Evidencia más reciente muestra la presencia de este receptor específicamente en el NAc. Por ejemplo,

- Mediante inmunohistoquímica y análisis de las muestras en el microscopio electrónico, se ha detectado la presencia del CB1 en sinapsis glutamatérgicas en el NAcS (Pickel, Chan, Kearn & Mackie, 2006) y particularmente en el NAcC (Pickel et al., 2006; Mátyás, Watanabe, Mackie, Katona & Freund, 2007).
- Winters et al. (2012) desarrollaron ratones mutantes en los cuales se coexpresan, en la misma célula, el CB1 y una proteína fluorescente de marcaje (td-Tomato, tdT, su expresión se distingue en color rojo). Así, la localización de tdT 'reporta' la expresión de CB1. La marca fluorescente reveló que el CB1 se expresa en neuronas espinosas medianas tanto en el NAcC como en el NAcS (Figura 5, B; Winters et al., 2012).

En relación con la relevancia funcional de estos receptores en la estructura de nuestro interés, Robbe, Alonso, Duchamp, Bockaert y Manzoni (2001) mostraron que la estimulación *in vitro* de la vía corteza prefrontal-NAc genera una respuesta excitadora en el NAc que disminuye significativamente cuando se aplica al medio un agonista del CB1 (WIN55,212-2; Robbe et al., 2001) (Figura 5, C, panel medio). Esta disminución en la respuesta del NAc se revierte cuando se aplica un fármaco antagonista del CB1 (SR141716-A). Cuando dicho antagonista está presente todo el tiempo en la preparación, la adición posterior del agonista no induce la disminución en la respuesta excitadora del NAc (Figura 5, C, panel inferior; Robbe et al., 2001). Este efecto fue confirmado más tarde por Pistis, Muntoni, Pillolla & Gessa (2002) *in vivo*, mediante la estimulación de las vías CPF-NAc y BLA-NAc (Pistis et al., 2002).

En suma, estos trabajos indican que el CB1 está presente en el NAc, y que la activación de estos receptores modifica la respuesta (excitabilidad) del NAc a la estimulación recibida por sus aferencias.



**Figura 5**

A modificado de Herkenham et al. 1991b; B modificado de Winters et al., 2012; C modificado de Robbe et al., 2001.

#### 4. Planteamiento del problema

El miedo condicionado a un contexto es un aprendizaje en el cual un lugar determinado adquiere la propiedad de predecir un potencial peligro. En el circuito neural que da lugar a dicho aprendizaje destacan estructuras límbicas como la amígdala, el hipocampo, y el NAc.

El NAc es una estructura límbica, telencefálica, que se divide anatómica y funcionalmente en NAcS y NAcC. La evidencia indica que el NAcC, específicamente, puede regular la adquisición del miedo condicionado a un contexto. Y se sabe que el sistema endocanabinérgico inhibe el aprendizaje del miedo condicionado a un contexto, cuando este sistema neuroquímico es activado inespecíficamente con agonistas administrados sistémicamente.

Se ha explorado poco el papel que tienen los diversos sistemas de neurotransmisión presentes en el NAc en el miedo condicionado. Y hasta ahora ningún trabajo había averiguado la posible función que tiene el sistema endocanabinérgico en el NAc en el miedo condicionado. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue investigar si existe dicha regulación endocanabinérgica, en el NAcC, sobre el miedo condicionado a un contexto.

#### 5. Hipótesis

**La activación del CB1 en el NAcC bloquea el aprendizaje del miedo condicionado a un contexto.** Este bloqueo se expresa como una disminución en el tiempo que una rata se congela cuando es expuesta de nuevo al contexto en el que recibió varias descargas eléctricas.

## **6. Objetivos**

- a) Determinar si la administración de un fármaco agonista del CB1 (AEA) en el NAcC antes del entrenamiento interfiere con el aprendizaje del condicionamiento del miedo a un contexto.
  
- b) Determinar si el bloqueo del aprendizaje inducido por activación del CB1 en el NAcC se limita al condicionamiento de miedo contextual, o se extiende también al condicionamiento de miedo a una señal auditiva.
  
- c) Debido a que AEA es un ligando también del receptor TRPV-1 fue importante determinar si el bloqueo del aprendizaje, inducido por la administración de AEA, se debe a la interacción del fármaco administrado con el CB1, y no a una interacción con algún otro receptor (p. ej., el citado TRPV-1).
  
- d) Determinar si el bloqueo del aprendizaje, inducido por la activación del CB1 con AEA, se restringe al NAcC, o también se presenta cuando se activa ese receptor en el NAcS.
  
- e) Determinar si la activación del CB1 en el NAcC impide sólo el aprendizaje, o también la consolidación del condicionamiento del miedo a un contexto.
  
- f) Debido a que la neurotransmisión canabinérgica disminuye la liberación de glutamato, y a que son glutamatérgicas las proyecciones de amígdala e hipocampo hacia el NAc, se

decidió explorar si el bloqueo del aprendizaje, inducido por la activación del CB1, se debe a la interrupción de la neurotransmisión glutamatérgica en el NAcC.

---

## Métodos

### 7.1. Sujetos

Se emplearon ratas machos de la cepa Wistar, de 250 a 300 gramos al momento de la cirugía. Estos animales fueron alojados en cajas individuales de acrílico, y mantenidos en un ciclo luz/oscuridad de 12/12 hrs. Las luces se encendían a las 9:00. Todos los experimentos se realizaron en la fase de luz, por ser en esta fase donde se observa un mejor desempeño de roedores en condicionamiento de miedo (Chaudhury & Colwell, 2002). Las ratas fueron obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina UNAM, y alojadas en otro bioterio anexo a nuestro laboratorio. Estas ratas tuvieron libre acceso a agua y alimento durante todas las fases experimentales. Los animales fueron manejados de acuerdo a la legislación local vigente concerniente al cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

### 7.2. Cirugía

Los animales fueron anestesiados con un combinado farmacológico de ketamina (66 mg/kg), xylazina (0.26 mg/kg) y acepromazina (1.2 mg/kg). Este combinado se administró I.P. Se les implantaron bilateralmente cánulas guía de calibre 23, dirigidas a 1 mm sobre

- a) el NAcC, siguiendo las coordenadas estereotáxicas A +1.7 mm y L  $\pm$ 1.4 mm a partir de bregma, -5.8 mm subdural de acuerdo al atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007), o
- b) el NaCS, siguiendo las coordenadas estereotáxicas A +1.4 mm y L  $\pm$ 1.4 mm a partir de bregma, -6.8 mm subdural (Paxinos & Watson, 2007).

Las cánulas guía fueron fijadas en el cráneo mediante dos tornillos de acero inoxidable y acrílico dental, y bloqueadas mediante estiletes de calibre 30 para evitar su obstrucción. Todos los animales tuvieron entre 4 y 6 días de reposo después de las cirugías.



### 7.3. Fármacos y administración

Se usó anandamida (N-araquidoniletanolamida; Sigma-Aldrich) como agonista del CB1. Se usó AM251 (1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-yodofenil)-4-metil-N-(piperidil)pirazol-3-carboxamida; Cayman Chemical Company) como antagonista del CB1. Se empleó glutamato (Sigma-Aldrich) para activar inespecíficamente a los receptores a este neurotransmisor.

Como vehículo de AEA y AEA + glutamato se empleó una solución de DMSO (dimetil sulfóxido) al 10% en PBS (salina amortiguada con buffer fosfatos) 0.1 M. Como vehículo para AM251 y AEA + AM251 se empleó una solución de DMSO 30% / polisorbato 80 (Tween 80) en PBS 0.1 M. Este último vehículo se eligió por la necesidad de agregar un detergente al vehículo para disolver AM251, dado que este fármaco tiene baja solubilidad en agua.

#### *Administraciones*

Las administraciones se hicieron a través de agujas dentales calibre 30, unidas mediante tubos de polietileno (Tygon) a microjeringas Hamilton de 10  $\mu$ L. Las agujas dentales fueron elaboradas para sobresalir 1 mm de la punta de las cánulas guía, y así alcanzar los sitios deseados de administración. Las microjeringas fueron controladas por una bomba de microinfusión (KD Scientific). Las administraciones se hicieron con los animales conscientes, sujetos a mano. Una vez retirados los estiletes, se insertaron las agujas dentales. El volumen total de todas las administraciones fue de 0.5  $\mu$ L por hemisferio, inyectado a razón de 0.333  $\mu$ L por minuto. Se permitió un minuto adicional, con las agujas dentales insertas en las cánulas guía, para permitir la difusión de las soluciones en el parénquima cerebral.

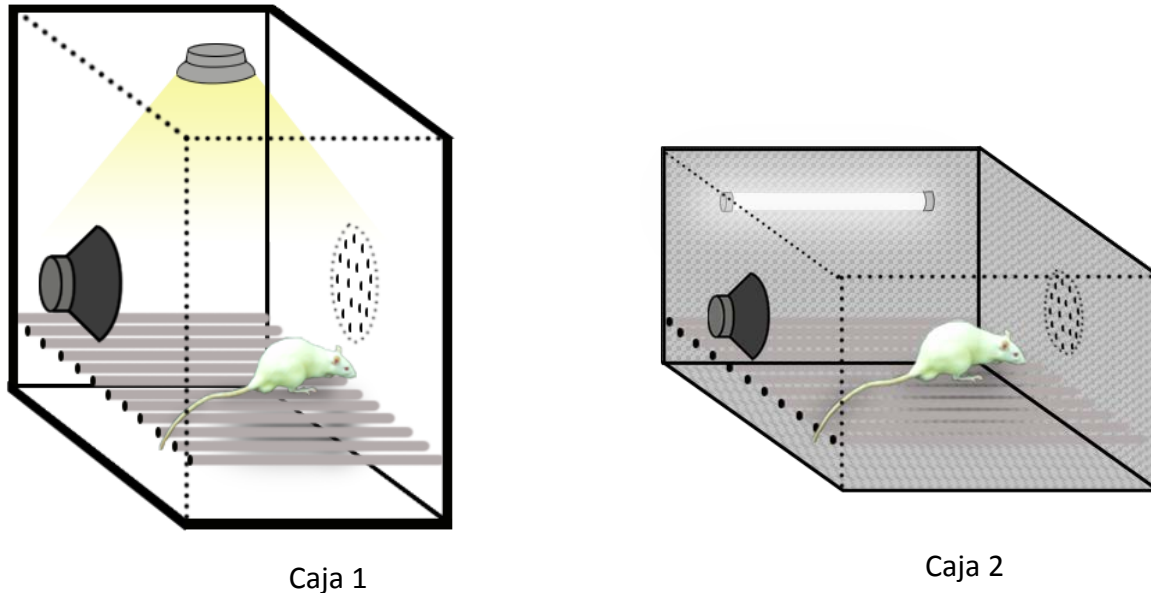
#### 7.4. Aparatos

Se emplearon dos cámaras experimentales. La primera de ellas (Caja 1, Figura 6) es una caja de madera de 50 cm de alto x 40.5 cm de ancho y 45 cm de fondo (medidas internas), con las paredes y techo pintados de blanco. El piso de la caja está compuesto por una reja, formada por barras de acero inoxidable de 0.6 cm de diámetro separadas 1 cm entre sí; a través de esta reja se administraron las descargas eléctricas. El techo de la caja cuenta con un foco dicróico de halógeno de 35 watts, mismo que se mantuvo encendido durante los experimentos. El techo de la caja cuenta también con dos ventiladores, que proporcionaron ruido de fondo durante los procedimientos conductuales realizados en esta caja. Esta caja cuenta con una puerta frontal con un vidrio de visión unilateral, de 47 cm de alto x 39 cm de ancho, el cual permite la observación de las ratas al interior de la caja.

La segunda caja de condicionamiento (Caja 2, Figura 6) es una caja con paredes y techo de aluminio sin pintar de 27.5 cm de alto x 36.5 cm de ancho y 35 cm de fondo. La iluminación de la caja fue provista por una lámpara fluorescente de 4 watts, misma que estuvo encendida durante toda la sesión experimental correspondiente. El piso de la caja está formado por un enrejado de barras de acero inoxidable, de 0.6 cm de diámetro espaciadas 1.3 cm entre sí. La puerta frontal de la caja cuenta con un vidrio de visión unilateral de 25.5 cm de alto x 35.5 cm de ancho, mismo que permite la observación de los animales al interior de la caja. Las cajas 1 y 2 fueron colocadas en la misma habitación. Las luces de esta habitación se mantuvieron apagadas durante los experimentos; por lo tanto, los animales no podían ver a través del vidrio hacia el exterior.

Se empleó un estimulador (Grass S-44) y una unidad de corriente constante (Grass CCU1A) para administrar las descargas eléctricas. También se emplearon una unidad de estimulación

auditiva (Grass S10CTCM), un amplificador RadioShack de 40 watts y un ecualizador estéreo Realistic para administrar los tonos auditivos. La activación del estimulador y de la unidad de estimulación auditiva fue coordinada por un generador de pulsos (Master-8, AMPI), el cual, a su vez, estuvo controlado por una PC, mediante un programa diseñado en Turbo Pascal 6.



**Figura 6**

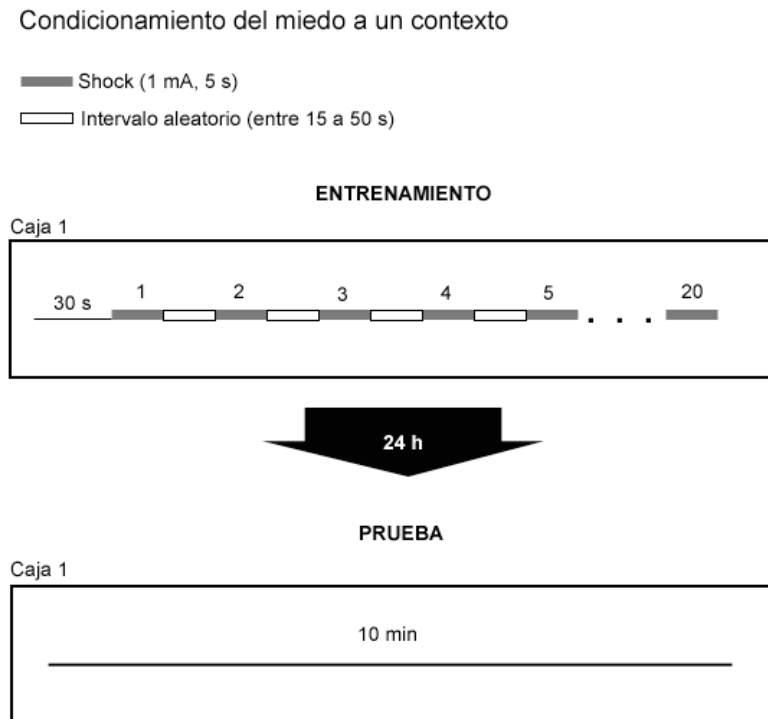
### 7.5. Procedimientos conductuales

#### *Condicionamiento del miedo contextual*

Cada animal fue colocado en la Caja 1, y se le permitió habituarse a la caja por 30 s. Después de esta habituación, recibió 20 descargas eléctricas a través del piso de la caja. Las descargas tuvieron 1 mA de intensidad y 5 s de duración. Dichas descargas fueron aplicadas a intervalos aleatorios de 3 a 10 módulos de 5 segundos; es decir, el intervalo entre descargas fue de 15 s como mínimo a 50 s como máximo. El tiempo total que cada rata pasó en la Caja 1 durante el entrenamiento estuvo determinado por el tiempo que la computadora necesitó para administrar las 20 descargas (típicamente, entre 12 y 15 min). Después del entrenamiento, las

ratas fueron colocadas de vuelta en sus cajas de acrílico. Los animales fueron puestos nuevamente en la Caja 1 al día siguiente del entrenamiento. Se permitió que cada rata permaneciera en la Caja 1 durante 10 min sin recibir descargas, tiempo durante el cual se evaluó la conducta de congelamiento mostrada por el animal. Esta sesión de prueba fue videograbada. El procedimiento conductual anteriormente descrito se esquematiza en la Figura 7.

Después de la sesión de entrenamiento de cada rata el piso, techo, y paredes interiores de la caja se limpiaron con una solución de cloro al 30%. Además, una bandeja colocada por debajo de la reja para recoger las excreciones de los animales fue retirada, vaciada y enjuagada.



**Figura 7**

### *Condicionamiento de miedo a una señal auditiva*

Los animales fueron entrenados en la Caja 1. Después del periodo de habituación de 30 s, cada rata recibió 20 descargas eléctricas con las mismas características que las descargas usadas en el condicionamiento contextual. Sin embargo, estas descargas estuvieron acompañadas de estímulos auditivos (tonos), mismos que tuvieron una frecuencia de 2 kHz, un volumen de 90 dB, y una duración de 10 s. Los tonos y las descargas fueron presentados de forma tal que la duración de las descargas coincidió con los últimos 5 s de duración del tono.

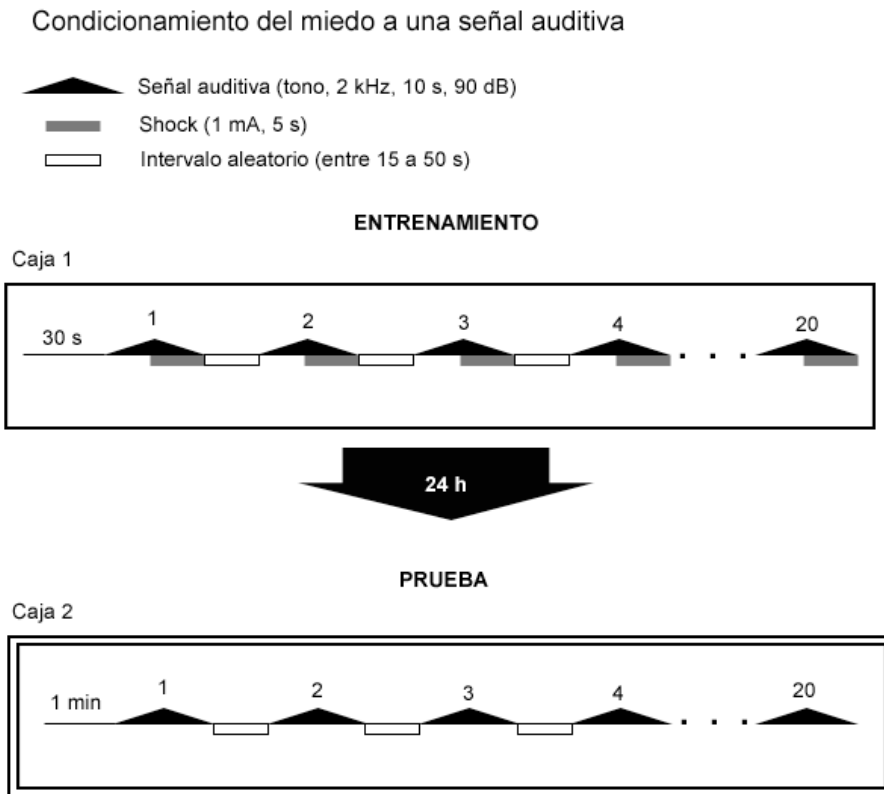
Después del entrenamiento, las ratas fueron devueltas a sus cajas de acrílico. Al día siguiente del entrenamiento, se colocó a cada animal en la Caja 2, y se le permitió explorar esta caja durante un minuto, durante el cual se evaluó la posible aparición de congelamiento hacia el contexto nuevo. Pasado este minuto, se presentaron 20 tonos con las mismas características físicas e intervalos entre tonos que los usados durante el entrenamiento. Sin embargo, las descargas fueron omitidas. La conducta de congelamiento se evaluó durante la aparición de cada uno de los tonos. Esta sesión de prueba también fue filmada. El procedimiento seguido se esquematiza en la Figura 8.

Después de ambas sesiones (entrenamiento y prueba), el interior de ambas cajas fue aseado con la solución de cloro, y las respectivas bandejas plásticas para la recolección de excreciones fueron vaciadas y enjuagadas.

### 7.6. Histología

Una vez terminados todos los experimentos, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico, administrado I.P. Las ratas fueron perfundidas usando una aguja intracardiaca (previo ligamiento de la aorta descendente) con PBS 0.1 M y con

paraformaldehído al 4% en PBS 0.1 M. Se extrajeron los cerebros, mismos que fueron suspendidos en paraformaldehído hasta la saturación del tejido. Posteriormente, fueron suspendidos progresivamente en sacarosa 18% y 30%. Durante los cambios en sacarosa se mantuvieron a 4°C. Los cerebros fueron congelados en un criostato (Leica CM1510 S) a -23 °C, y cortados en secciones coronales de 40 µm de espesor. Estos cortes fueron montados en laminillas, teñidos con violeta de cresilo, y analizados bajo el microscopio de campo claro. Todos los animales con una ubicación errónea de las cánulas fueron descartados del análisis estadístico.



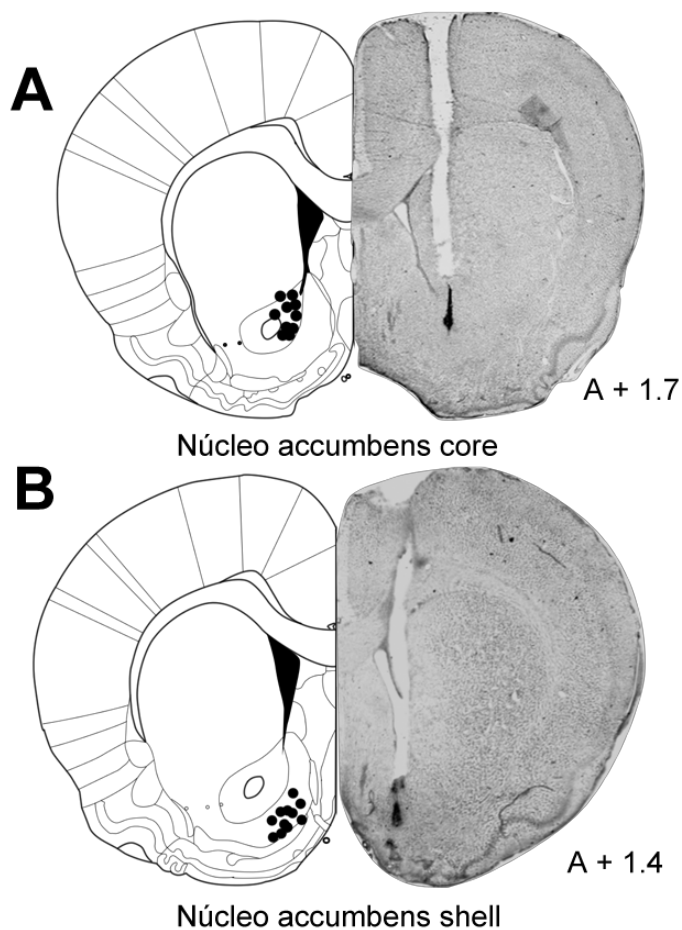
**Figura 8**

### 7.7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los experimentos de condicionamiento de miedo contextual fueron sometidos a prueba de hipótesis usando ANOVA de una vía. Para buscar diferencias específicas entre grupos se usó la prueba post-hoc de Tukey. Para la prueba de hipótesis de los datos obtenidos en el experimento de condicionamiento de miedo a la señal auditiva se usó ANOVA de medidas repetidas, seguida del análisis a través de la prueba post-hoc de Tukey para muestras desiguales. En todos los experimentos se aceptó la significancia de los efectos si  $p > 0.05$ . Los datos se analizaron usando los programas SPSS y Statistica (este último para analizar los datos del experimento sobre condicionamiento del miedo a la señal, puesto que la prueba estadística necesaria no se encuentra en el repertorio de pruebas del SPSS).

## 8. Resultados

En la Figura 9 se muestran microfotografías representativas de cortes con una ubicación de cánulas considerada como correcta, y su correspondiente sitio de inyección de fármacos. Del lado izquierdo de las imágenes (con respecto al lector) se esquematiza la ubicación de los sitios de inyección en 10 casos de animales implantados en el NACc (panel superior), y en 11 casos de animales implantados en el NAcS (panel inferior). No se incluyeron todos los casos en la figura para mantener la claridad en los esquemas.



**Figura 9**



En ambos condicionamientos (contextual y a la señal auditiva) se incluyó un grupo intacto para analizar el comportamiento de las ratas en condiciones lo más cercanas a las fisiológicas posibles. Con “intacto” nos referimos a animales que no sufrieron ninguna intervención quirúrgica; es decir, animales que sólo fueron sometidos a los procedimientos conductuales antes descritos.

Para el condicionamiento contextual se incluyeron 18 animales intactos, mismos que aparecen en todas las gráficas y análisis estadísticos relativos a este condicionamiento. Para el condicionamiento a la señal auditiva, se incluyeron 10 animales intactos. El congelamiento observado en estos grupos intactos fue de  $50.08\% \pm 6.27$  (media  $\pm$  error estándar) para el condicionamiento contextual, y de  $78.47\% \pm 7.79$  (media  $\pm$  error estándar) para el condicionamiento a la señal auditiva. La prueba ANOVA de una vía y el análisis post-hoc de Tukey no hallaron diferencias significativas entre los grupos intactos y los grupos vehículo de todos los experimentos de condicionamiento contextual ( $F_{(4, 47)} = 1.61$ ). Asimismo, cuando se comparó el tiempo total de congelamiento de todos los grupos controles (intactos y vehículo, condicionamientos contextual y al tono) a lo largo de sus respectivas sesiones de prueba, no se hallaron diferencias entre los grupos ( $F_{(6, 64)} = 2.73$ ).

Los datos que se proporcionan en las figuras están expresados como media + error estándar de los porcentajes de tiempo de congelamiento con respecto al tiempo de duración total de la prueba respectiva (excepto en los datos del experimento 2, que se expresan en segundos).

### 8.1. La activación del receptor CB1 en el NAcC antes del entrenamiento impide la adquisición de miedo condicionado al contexto

Como puede verse en la Figura 10, todas las dosis de AEA administradas en el NAcC lograron reducir significativamente el congelamiento, en comparación con los grupos controles (intactos y vehículo). La prueba ANOVA de una vía ( $F_{(5, 53)} = 9.74$ ,  $p < 0.001$ ) y el análisis de Tukey mostraron que los grupos de AEA 56  $\mu\text{M}$  ( $n = 10$ ), 5.6 mM ( $n = 11$ ), 11.4 mM ( $n = 8$ ) y 56 mM ( $n = 4$ ) fueron diferentes de los grupos de animales intactos y de los animales vehículo ( $n = 9$ ) (en todos los casos,  $p < 0.05$ ). No se encontraron diferencias entre los grupos controles. Estos datos indican que la activación del CB1 en el NAcC bloquea la adquisición del miedo condicionado a un contexto.

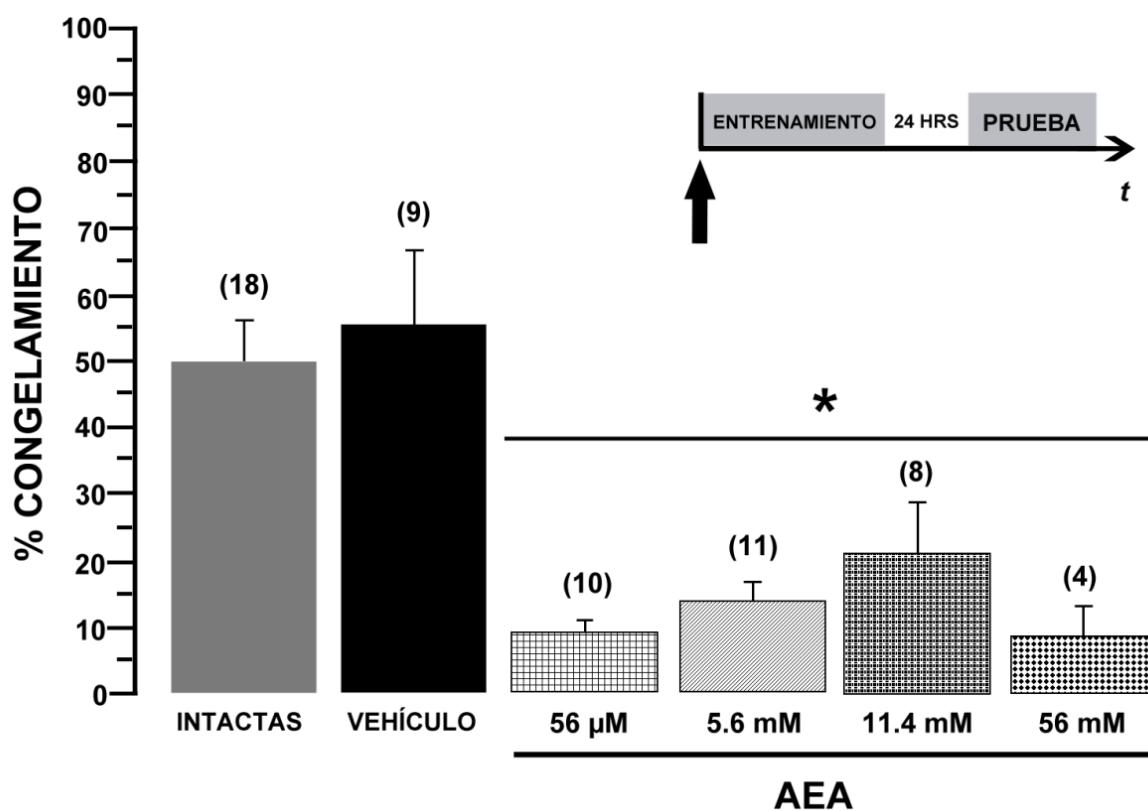


Figura 10

## 8.2. La activación del receptor CB1 en el NAcC antes del entrenamiento no bloquea la adquisición del miedo condicionado a una señal auditiva

Como puede verse en la Figura 11, ninguna de las dosis administradas en el NAcC redujo significativamente el congelamiento durante la presentación de los tonos auditivos. El número de sujetos fue de 10 para el grupo de 56  $\mu$ M, 9 para el grupo 5.6 mM, 8 para el grupo 56 mM de AEA, y 9 para el grupo vehículo.

El panel A de la Figura 11 muestra el congelamiento mostrado durante el primer minuto de la prueba al contexto nuevo (Caja 2). Las pruebas ANOVA de una vía y post-hoc de Tukey no hallaron diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(4, 41)} = 1.81, p = 0.144$ ) durante este primer minuto. El panel B de la Figura 11 muestra el congelamiento mostrado por los animales durante la presentación de los tonos auditivos. Con el fin de mostrar los datos con claridad, se combinaron los datos obtenidos durante la aparición de uno de los tonos con los datos obtenidos durante la presentación del tono siguiente; así, en el citado panel se muestran 10 puntos en el tiempo (correspondientes a los 20 tonos). El análisis estadístico se hizo sobre los datos agrupados de esta forma.

La prueba ANOVA para medidas repetidas no encontró una interacción significativa entre los factores grupo y tono ( $F_{(36, 369)} = 0.90, p = 0.63$ ). Asimismo, no se encontraron diferencias entre los grupos ( $F_{(4, 41)} = 2.12, p = 0.09$ ). Sin embargo, sí se hallaron diferencias entre los tonos ( $F_{(9, 369)} = 12, p < 0.01$ ). Consecuentemente, la prueba de Tukey para muestras desiguales mostró que los tonos [3,4]<sup>2</sup> fueron diferentes de los tonos [13,14] a [19, 20]; los tonos [5,6] fueron diferentes de

---

<sup>2</sup> Los números entre corchetes indican la pareja de tonos de la que se está hablando. Así, [1,2] se refiere a los datos promediados del tono 1 y del tono 2, [3,4] se refiere a los datos promediados del tono 3 y el tono 4, y así sucesivamente.

los tonos [11, 12] a [19, 20]; los tonos [7,8] fueron diferentes de los tonos [15, 16] a [19, 20]; y los tonos [19, 20] fueron diferentes de los tonos [9, 10] a [13, 14]. El panel C de la Figura 11 muestra el tiempo total de congelamiento mostrado por las ratas durante la presentación de todos los tonos. No se encontraron diferencias entre los grupos al comparar los datos para el tiempo total de congelamiento ( $F_{(4, 41)} = 2.12, p = 0.096$ ). Los resultados anteriores sugieren que la activación del CB1 en el NAcC no interfiere con la asociación entre los tonos auditivos y las descargas.

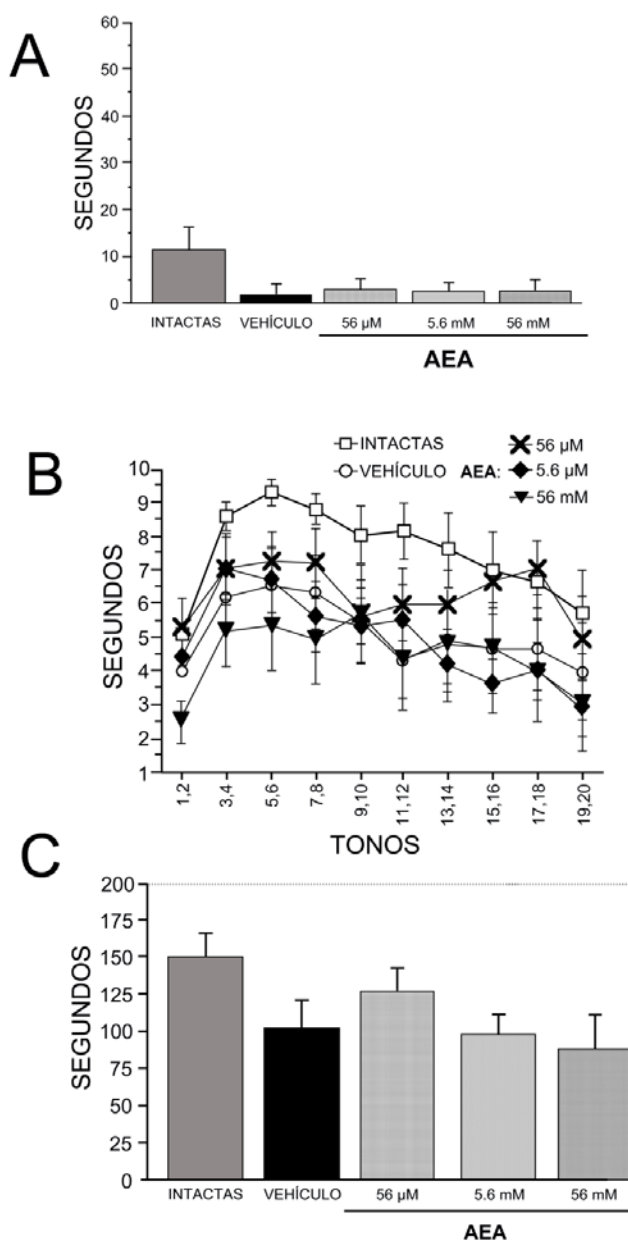


Figura 11

### 8.3. El bloqueo del receptor CB1 revierte la interferencia canabinérgica sobre la adquisición del miedo condicionado a un contexto

En la Figura 12 se muestra que la administración de 2 mM de AM251 no tuvo un efecto por sí mismo en la conducta ( $n = 9$ ). Sin embargo, esta dosis de AM251 sí logró revertir el efecto conductual inducido por la dosis efectiva de AEA ( $n = 9$ ). Consecuentemente, las pruebas ANOVA de una vía y post-hoc de Tukey no hallaron diferencias significativas ( $F_{(3, 40)} = 1.11, p = 0.356$ ) entre los grupos. Por lo tanto, estos datos sugieren que el efecto de AEA en el NAcC sobre la adquisición del miedo condicionado a un contexto se debe a la activación CB1.

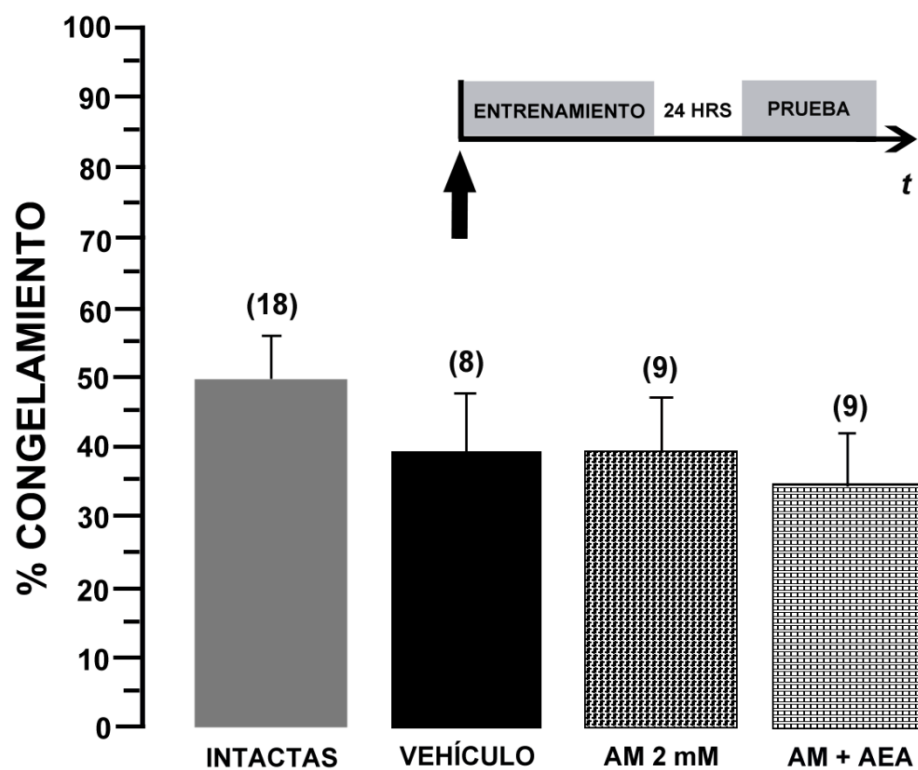


Figura 12

#### 8.4. La activación del receptor CB1 en el NAcS no impide la adquisición del miedo condicionado al contexto

La dosis de 56  $\mu\text{M}$  de AEA ( $n = 13$ ) no reduce significativamente el congelamiento en comparación con los grupos controles (vehículo:  $n = 11$ ). Las pruebas ANOVA de una vía y post-hoc de Tukey no hallaron tales diferencias ( $F_{(2, 39)} = 3.20$ ;  $p = 0.52$ ). Estos datos permiten suponer, de forma tentativa, que no hay una regulación canabinérgica en el NAcS sobre el miedo condicionado a un contexto.

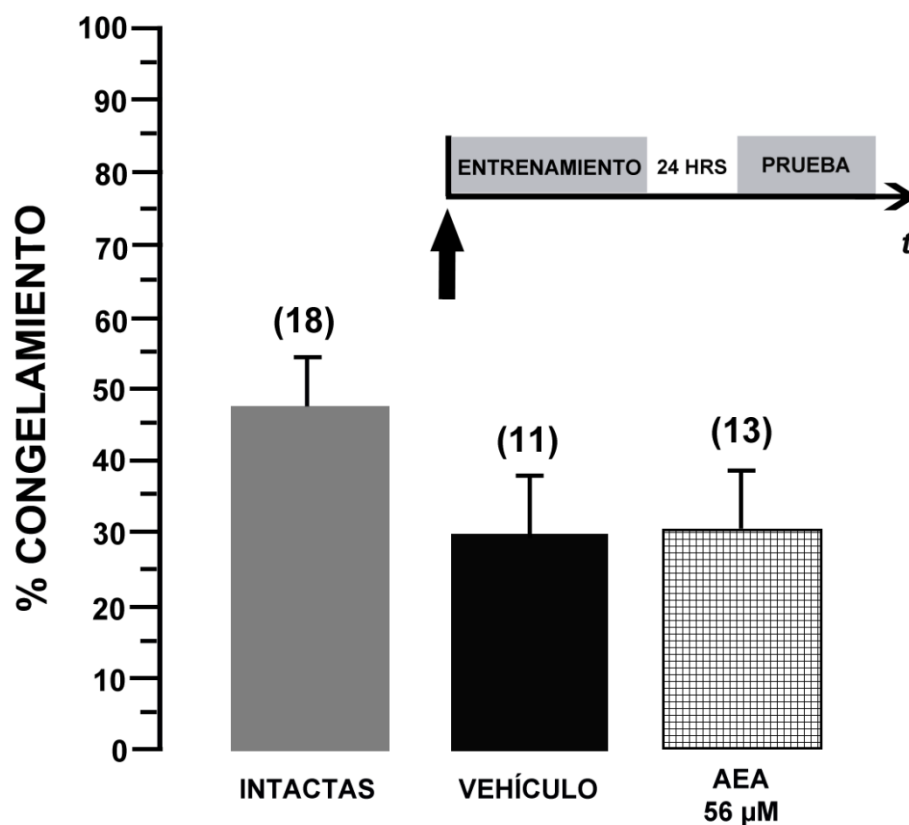


Figura 13

### 8.5. La activación del receptor CB1 en el NAc después del entrenamiento no afecta la consolidación del miedo condicionado al contexto

La Figura 14 muestra que la dosis de 56  $\mu\text{M}$  de AEA ( $n = 7$ ) no disminuye significativamente el congelamiento en comparación con los grupos controles (vehículo:  $n = 7$ ). Así lo revelaron las pruebas ANOVA de una vía y post-hoc de Tukey ( $F_{(2, 29)} = 3.18, p = 0.056$ ). Por lo tanto, este resultado sugiere que la activación del CB1 en el NAc no interfiere con la consolidación del miedo condicionado al contexto.

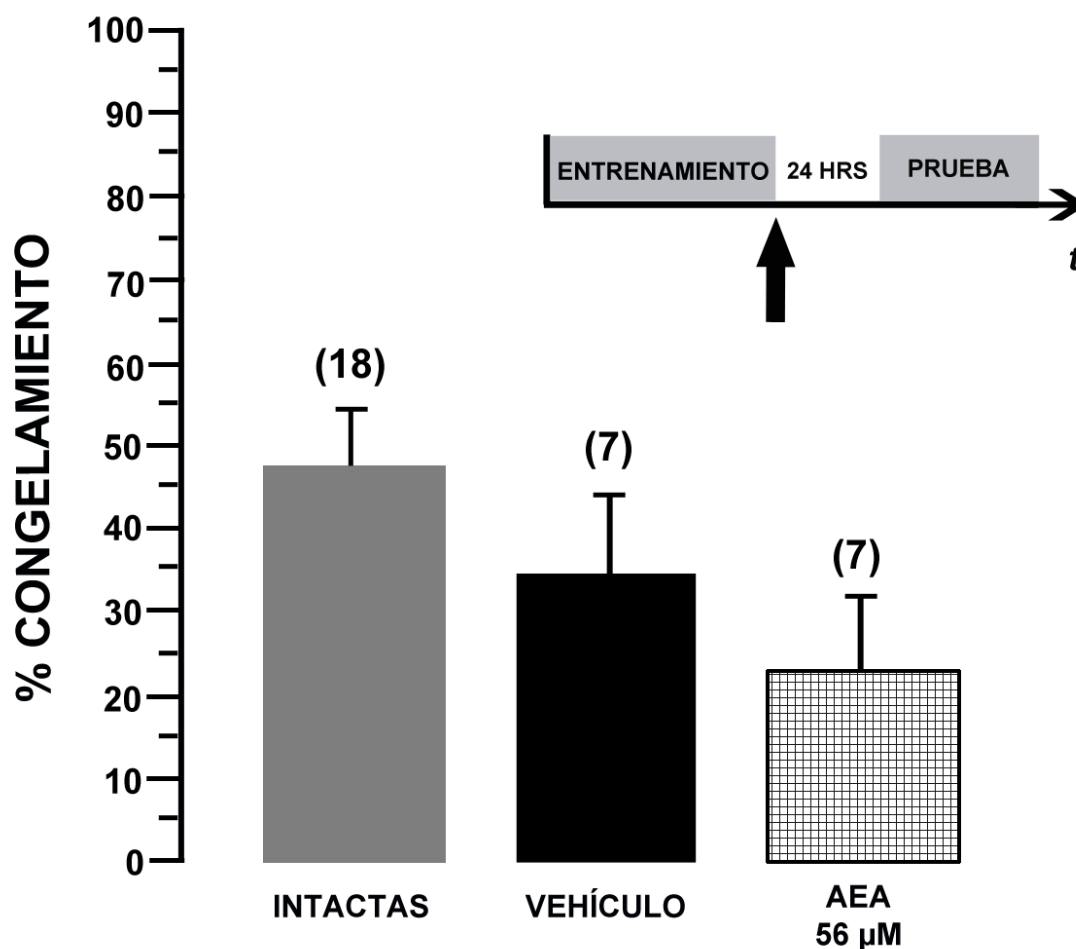


Figura 14

### 8.6. La administración de glutamato revierte los efectos de AEA en el NAcC.

Para indagar si el efecto de AEA sobre el condicionamiento se debe al bloqueo de la transmisión glutamatérgica en este núcleo, se decidió coadministrar la dosis efectiva de AEA (56  $\mu$ M) y una dosis no tóxica de glutamato (3.5 mM; esta dosis se eligió debido a que es una concentración típica encontrada por nuestro laboratorio en el cerebro, cuando se evalúan muestras de tejido mediante electroforesis capilar). Como se muestra en la Figura 15, la administración de glutamato en el NAcC ( $n = 9$ ) antes del entrenamiento en el condicionamiento de miedo contextual bloquea la disrupción en el condicionamiento inducida por AEA. Las pruebas ANOVA de una vía y post-hoc de Tukey no hallaron diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2, 34)} = 1.26$ ,  $p = 0.297$ ). Por lo tanto, el efecto disruptivo de AEA sobre la adquisición del condicionamiento de miedo contextual podría deberse a la interrupción de la neurotransmisión glutamatérgica en el NAcC.

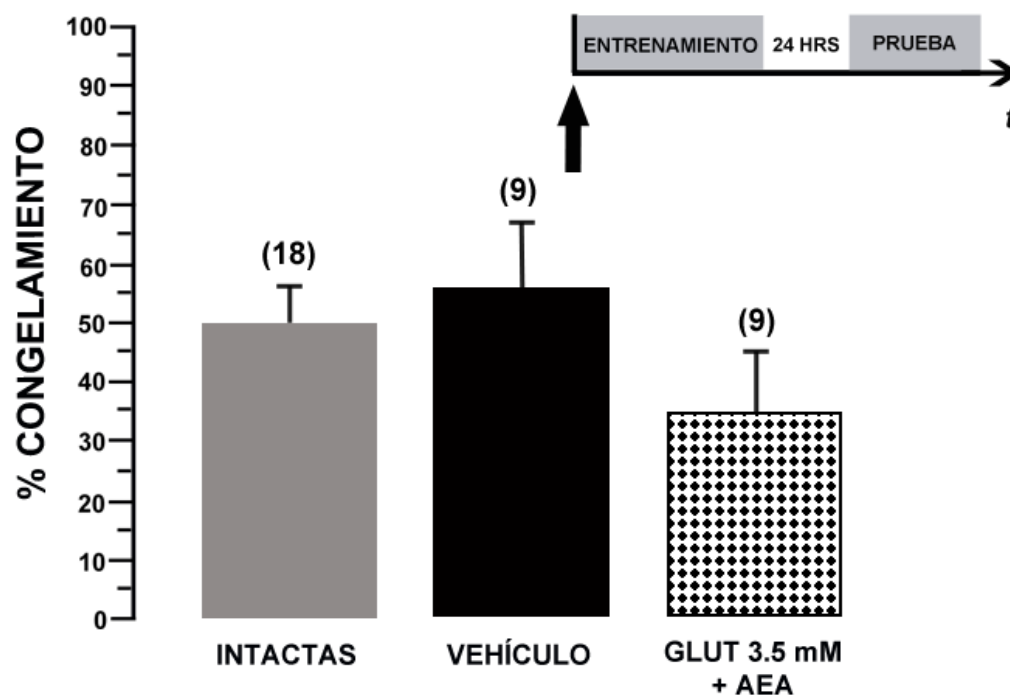


Figura 15



## 9. Discusión.

Los experimentos reportados en este trabajo tuvieron como propósito confirmar o descartar una regulación canabinérgica, en el NAc, sobre el condicionamiento del miedo contextual. Como consecuencia de dichos experimentos, se considera en este trabajo suficientemente sustentada la hipótesis de que, efectivamente, la activación del receptor CB1 en el NAcC dificulta la adquisición del miedo condicionado a un contexto. Sin embargo, existen otras implicaciones derivadas del trabajo experimental aquí realizado, mismas que se discuten en las páginas siguientes. Las principales conclusiones de este trabajo serán presentadas al final de esta discusión.

### 9.1. El miedo generado por el condicionamiento, y otras cuestiones conductuales

Primero, es importante mencionar que el congelamiento total que mostraron todos los grupos controles de todos los experimentos no difirió entre esos grupos. De acuerdo a la teoría de aprendizaje propuesta por Rescorla y Wagner (1972), la fuerza asociativa de un EC depende de la precisión con la que dicho estímulo predice la aparición del EI. Debido a que el tono predice de forma mucho más precisa la aparición de la descarga que un contexto (que siempre está presente), la asociación formada entre el EI y el tono debiera ser más fuerte que la asociación hecha entre el EI y el contexto. Así, los tonos serían capaces de producir más congelamiento que el contexto. Esta hipótesis ha sido comprobada experimentalmente por Odling-Smee (1975), y por Phillips y LeDoux (1992). Sin embargo, como ya se mencionó, en el presente trabajo no hay diferencias entre los grupos controles de todos los experimentos.

La anterior observación es relevante puesto que indica que el nivel de miedo generado por los tonos o por el contexto es equivalente. Por lo tanto, la diferencia en el efecto producido por la activación del receptor CB1 en el condicionamiento contextual en comparación con el condicionamiento a los tonos no puede explicarse como un efecto sobre la fuerza asociativa del condicionamiento. En otras palabras, la posibilidad de que la administración de AEA afectara el condicionamiento 'débil' (contextual) pero no el 'fuerte' (a la señal) no es convincente.

En relación con la intensidad de la corriente usada en el presente estudio, se eligió una intensidad (1 mA) que garantizara la asociación contexto-descarga o tono-descarga. La corriente administrada, a pesar de ser ligeramente mayor a la usada en la mayoría de los estudios de condicionamiento del miedo (en los cuales es común encontrar corrientes máximas de 0.6-0.7 mA en ratas, p. ej., Schwienbacher, Fendt y Schnitzler, 2005; Plendl & Wotjak, 2010; Urcelay & Miller, 2010), no ocasionó lesiones evidentes en ninguna parte del cuerpo de ninguna de las ratas empleadas en este estudio. Además, dicha intensidad de corriente se ha usado antes en otros estudios (p. ej., Antoniadis & McDonald, 1999; McDannald & Galarce, 2011), e incluso intensidades mayores (p. ej., 1.5 mA en Pamplona & Takahashi, 2006, o hasta 2 mA en Schafe & LeDoux, 2000) sin que se hayan reportado lesiones en los animales.

En suma: el miedo generado tanto a la señal auditiva como al contexto son equiparables y, por lo tanto no constituyen el motivo por el cual se observaron diferencias con la administración de AEA en uno u otro modelo. Asimismo, no se encuentra ni en este trabajo ni en otros hallados en la literatura que la corriente aplicada a las ratas les cause a estas últimas afecciones en las extremidades. Una vez abordadas estas cuestiones conductuales, se analiza a continuación el efecto farmacológico de AEA en el NAcC sobre la conducta.

## 9.2. Las dosis y el efecto farmacológico de AEA en el condicionamiento contextual

Como se muestra en la primera gráfica de los resultados (Figura 10), todas las dosis de AEA inyectadas en el NAcC fueron efectivas para reducir el congelamiento. Es particularmente llamativo el hecho de que la dosis más baja (56  $\mu$ M) sea suficiente para reducir significativamente el congelamiento. Lo anterior sugiere que el incremento en la dosis es redundante, puesto que ninguna dosis mayor a 56  $\mu$ M redujo aún más el congelamiento. Es decir, se alcanzó un llamado 'efecto techo'. En relación con este punto es importante notar la afinidad AEA-CB1: la constante de afinidad de AEA reportada es de  $52 \pm 1.8$  nM (Devane et al., 1992). Debido a que la dosis más baja usada en el presente trabajo fue de 56  $\mu$ M, es razonable suponer la dosis más baja usada en esta tesis es lo suficientemente alta como para activar completamente al CB1; por lo tanto, un aumento de esa dosis no produce un efecto significativo en la conducta.

Otro asunto importante a tener presente es que el efecto de AEA sobre la conducta es, principalmente, un **efecto farmacológico**. Esto quiere decir que la posible regulación de los endocannabinoides naturalmente, fisiológicamente liberados en el NAcC durante el condicionamiento contextual aún se desconoce, puesto que en el presente trabajo no fue directamente evaluada. Cualquier inferencia hecha sobre el funcionamiento natural del sistema endocannabinérgico a partir de los resultados de esta tesis ha de tener en consideración, por necesidad, el desconocimiento factual de cómo trabaja dicho sistema neuroquímico durante el aprendizaje de miedo a un contexto o a una señal auditiva.

El único trabajo en la literatura que ha investigado al sistema endocannabinérgico en el NAcC de animales bajo estrés es el de Wang et al. (2010). Estos autores sometieron ratones a tratamientos estresantes (p. ej., inclinación de las cajas-habitación de los ratones a 45°,

---

presentación de sonidos de predadores, restricción de movimiento, aserrín mojado en las cajas, etc.) durante una o de 5 a 6 semanas. Dicho estudio muestra que la característica atenuación de las respuestas excitadoras del NAc evocada por la actividad del CB1 (ver Robbe et al., 2001, o Figura 5, C) se reduce sólo en los animales expuestos a los estresores 'crónicos' (5-6 semanas; Wang et al., 2010). En otras palabras, la capacidad del sistema endocannabinérgico de inhibir las respuestas excitadoras del NAc se reduce con varias semanas de estrés continuo. Ninguno de los protocolos de estrés alteran las concentraciones de AEA ni de 2-AG en el tejido (Wang et al., 2010).

Los datos del trabajo de Wang et al. (2010) parecen apoyar la idea central de esta tesis: que el sistema endocannabinérgico en el NAc está menos activo durante situaciones estresantes. Sin embargo, es necesario mantener varias cuestiones presentes. En primer lugar, el intervalo de tiempo más corto usado por Wang et al. (2010) es mucho más prolongado que la duración total de los experimentos realizados en esta tesis, por lo que el problema de conocer cuál es el funcionamiento del sistema endocannabinérgico durante el condicionamiento del miedo sigue sin saberse. En segundo lugar, si el efecto principal (bloqueo del aprendizaje del miedo condicionado a un contexto por la activación del CB1) hallado en esta tesis se debiera a una alteración del sistema endocannabinérgico producida por estrés, entonces también el miedo condicionado a la señal auditiva debió afectarse significativamente.

Para comprender mejor los resultados arrojados por la investigación de esta tesis sería sumamente útil saber cómo responde el sistema endocannabinérgico (liberación de endocannabinoides en el tejido, supresión de la excitación o de la inhibición inducidas por despolarización, plasticidad del tipo LTD, etc.) durante el aprendizaje del miedo condicionado.

Otra cuestión importante es la AEA en sí misma. Se usó esta sustancia por ser uno de los endocannabinoides más abundantes en el cerebro. La idea de fondo fue imitar lo mejor posible las supuestas condiciones fisiológicas que debían suceder en el cerebro de animales que aprenden a temerle a contextos nuevos. Sin embargo, una importante cuestión farmacológica es que AEA es también un agonista del receptor TRPV1 (mencionado en la sección 3.1.2 de la introducción de esta tesis). Como tal, era importante tener certeza de que los efectos de la administración de AEA se debieron a su interacción con el receptor CB1, y no con el receptor TRPV1. La importancia de saber si AEA interfería con el condicionamiento contextual adquiere mayor relevancia debido a que está demostrado que el receptor TRPV1 está presente en el NAc (Roberts, Davis & Benham, 2004), y a que se sabe que ratones mutantes carentes del receptor TRPV-1 muestran deficiencias para aprender los condicionamientos contextual y a una señal, siempre que son entrenados bajo condiciones altamente aversivas (descargas eléctricas de elevada intensidad) (Marsch et al., 2007). Por estas razones se realizó el tercer experimento de esta tesis (administración conjunta de AEA con un antagonista del receptor CB1, Figura 12).

Se eligió AM251 por ser un fármaco que se une con mayor afinidad al receptor CB1 (Gatley, Gifford, Volkow, Lan & Makriyannis, 1996), y tener actividad antagonista/agonista inverso para dicho receptor (Gatley et al., 1996; Gatley, Lan, Pyatt, Gifford, Volkow & Makriyannis, 1997; Gatley et al., 1998; Ahn, Bertalovitz, Mierke & Kendall, 2009). La dosis fue elegida por no generar cambios conductuales evidentes cuando es administrada en el NAc (Soria-Gómez et al., 2007). El objetivo del experimento fue que el fármaco antagonista compitiera por los receptores CB1 disponibles en el NAc, y así bloqueara su activación por AEA. La Figura 12 confirma esa suposición: cuando se administran juntos AEA y AM251, el efecto inhibitor de AEA en el miedo condicionado al contexto se bloquea. Este experimento permite afirmar que el bloqueo del

---

---

aprendizaje del miedo condicionado al contexto inducido por AEA se debe a que esta sustancia interactúa con el receptor CB1, y no con otro receptor (como el TRPV1).

En conclusión: AEA bloquea el aprendizaje del miedo condicionado a un contexto, gracias a que interactúa específicamente con el receptor CB1. La dosis más baja usada en los experimentos aquí reportados es suficiente para activar completamente al receptor CB1 e interferir con el condicionamiento, de forma que todos los incrementos a esa dosis no cambian significativamente el efecto observado. Esta interferencia canabinérgica con el aprendizaje del miedo contextual es, esencialmente, un efecto farmacológico, puesto que la regulación fisiológica, natural, del sistema endocanabinérgico en el NAcC durante este aprendizaje se desconoce.

Una vez establecido el mecanismo farmacológico por el que AEA interfiere con el aprendizaje, es importante analizar el momento en el que se observa dicha interferencia.

### 9.3. El momento en el cual la AEA interfiere con el condicionamiento contextual

Los hallazgos de la presente investigación concuerdan con otros trabajos previamente reportados, en el sentido de que el NAcC interviene en la adquisición del miedo condicionado (mencionados en la introducción).

Resulta de particular importancia el estudio de Levita et al. (2002), en el cual se halló que la lesión del NAcC antes o después del entrenamiento interfiere con el condicionamiento contextual. Este trabajo es relevante porque encuentra resultados semejantes a los descubiertos en nuestra investigación: la inactivación (lesión en el trabajo de Levita et al (2002), o inducida por endocannabinoides en el nuestro) del NAcC antes del entrenamiento interfiere con la adquisición del miedo condicionado a un contexto (Levita et al., 2002). En otras palabras, nuestros resultados confirman los de Levita et al. (2002). Sin embargo, en el trabajo de Levita et al. (2002) la lesión

hecha después del entrenamiento también interfiere con el condicionamiento, efecto que en nuestro trabajo aparentemente no sucede.

Por otra parte, en estudios de electrofisiología, la estimulación de ninguna de las dos subregiones del NAc tiene efecto en el mantenimiento del LTP en el giro dentado del hipocampo (Kudolo et al., 2010). No obstante, la estimulación eléctrica del NAcC bloquea la inducción de LTP, mientras que la estimulación del NAcS incrementa la magnitud de dicho LTP; López, Almaguer, Pérez, Frey & Bergado, 2008; Kudolo et al., 2010). Considerando al LTP como un modelo celular/molecular de aprendizaje y memoria, el hecho de que la estimulación del NAcC no afecte el mantenimiento del LTP pero sí la inducción de dicho fenómeno de plasticidad es concordante con la propuesta de esta tesis: que el NAcC no participa en la consolidación del miedo condicionado a un contexto, o por lo menos no a través del sistema endocanabinérgico. Este último punto requiere de más explicación.

Es importante aclarar que, si bien con nuestros experimentos no podemos sustentar la idea de que el sistema endocanabinérgico en el NAc regula la consolidación del miedo condicionado a un contexto, esto no excluye la posibilidad de que dicha regulación exista en esta estructura, pero a través de otros sistemas o mecanismos neuroquímicos (p. ej., síntesis de nuevas proteínas). En principio, se conoce que el NAc sí participa en la consolidación de otras memorias (Hernandez et al., 2002; Li & Fleming, 2002), incluyendo memorias aversivas (Pedroza-Llinás et al., 2009). En el ya muchas veces mencionado trabajo de Levita et al. (2002), la lesión del NAc sí impide la consolidación del miedo condicionado contextual (Levita et al., 2002). Es importante considerar que pudiera existir algún otro mecanismo mediante el cual se logre una regulación del NAc en la consolidación de la memoria aquí estudiada.

Estos datos, junto con los obtenidos en esta tesis, sugieren que si bien es muy probable que el NAc tenga una regulación en la consolidación de memorias espaciales, la naturaleza de dicha regulación no está clara. Nuestro trabajo indica, no obstante, que el sistema endocannabinérgico no forma parte de dicha (e hipotética) regulación.

Finalmente, en el quinto experimento reportado en el presente trabajo (administración post-entrenamiento de AEA en el NAc, en el miedo contextual, Figura 14) la activación farmacológica del receptor CB1 no modifica significativamente la conducta en los animales experimentales, en comparación con los controles. Sin embargo, el estadístico obtenido ( $p = 0.56$ ) es sólo ligeramente mayor al nivel de significancia establecido para la ANOVA ( $p = 0.5$ ). La probabilidad inmediata que surge es que, variando las condiciones experimentales (p. ej., incrementando el número de animales usados), semejante resultado alcance la significancia estadística.

En la Figura 14 se observa que tanto el grupo experimental como el control (vehículo) muestran menos congelamiento que los animales intactos. Podría suponerse que existió alguna variable no controlada (relacionada con la cirugía, por ser en los animales operados en quienes se observa dicha reducción en el congelamiento), misma que es la responsable de la disminución en el congelamiento. En otras palabras, es factible que la diferencia que se detecta con la prueba estadística se deba a la diferencia de los grupos sometidos a cirugía contra el grupo intacto, y no a un efecto farmacológico de AEA sobre la consolidación de la tarea.

Como una alternativa para explorar esta segunda posibilidad, el grupo administrado con AEA fue comparado con el grupo vehículo por medio de una prueba t. Dichos grupos no difieren significativamente entre sí ( $t_{12} = -0.986$ ,  $p = 0.383$ ). Si existe un efecto de AEA sobre el congelamiento, dicho efecto debería ser detectable al comparar animales experimentales contra



vehículos. Al no hallarse significancia entre ambos grupos, se favorece la posibilidad de que no exista, de hecho, un efecto de AEA en la conducta de los animales.

Por lo tanto, y atendiendo estrictamente a la estadística de la evidencia experimental, afirmamos que no existe una interferencia de la activación del receptor CB1 en el NAcC sobre la consolidación del condicionamiento del miedo a un contexto. Si bien es cierto que existe la posibilidad de que esta conclusión constituya un error estadístico de tipo II, también lo es el hecho de que dos pruebas estadísticas independientes (ANOVA y t) no lograron encontrar diferencias entre el grupo experimental y el control, lo cual apoya la falta de efecto de AEA en la consolidación del miedo condicionado al contexto.

El siguiente punto relevante de los experimentos aquí reportados es la subregión del NAc en la cual existe la regulación endocannabinérgica sobre el miedo condicionado descubierta por nuestro trabajo.

#### 9.4. La subregión del NAc que participa en el condicionamiento contextual

Como se mencionó en la introducción de esta tesis, el NAc se divide en dos subregiones anatómicas y funcionales distintas. Un objetivo importante de esta tesis consistió en verificar que la interferencia con el condicionamiento inducida por AEA se restringiera al NAcC o, por el contrario, que todo el NAc (sin importar la subregión) forma parte del circuito neural que posibilita la adquisición del miedo condicionado a un contexto.

En primer lugar, una preocupación razonable es que el volumen de administración pudiera ser lo suficientemente grande como para que los fármacos se difundieran más allá del sitio deseado de administración. Esto es, que si la administración de AEA se deseaba en el NAcC, dicho

---

fármaco no se difundiera también al NAcS (y viceversa, que el fármaco se difundiera al NAcC cuando se deseaba administrar sólo en el NAcS). Al respecto de este problema, se seleccionó un volumen de administración (0.5  $\mu$ L) ya reportado en otros trabajos (p. ej., Soria-Gómez et al., 2007; Pedroza-Llinás et al., 2009; Núñez-Jaramillo et al., 2012) que permite obtener resultados conductuales diferentes cuando se le administra ya sea en el NAcC o en el NAcS. Incluso se han empleado volúmenes tan extensos como 1  $\mu$ L (p. ej., Haralambous & Westbrook, 1999; Fenu et al., 2001; Ramírez-Lugo et al., 2006) que permiten seguir observando efectos diferentes entre ambas subregiones del NAc.

No obstante, para esta tesis se hicieron administraciones, en animales anestesiados, de 0.5  $\mu$ L de tinta china negra o de rojo de Ponceau en las mismas regiones y bajo las mismas condiciones de infusión (ver sección 7.3) que en los animales experimentales. En estas observaciones no se halló el colorante en cuestión fuera de los límites de la subregión del NAc en la cual se deseaba infundir el tinte. Si bien es verdad que las propiedades físicas del vehículo y los fármacos administrados son distintas a las de los colorantes, y que mientras los colorantes no se difundieron más de lo deseado, los fármacos sí pudieron haber excedido los límites de las subregiones de interés, las observaciones conductuales y la evidencia publicada parecen apoyar la idea de que la difusión de los fármacos sucedió de acuerdo a lo esperado.

Con respecto a la evidencia experimental hallada en el cuarto experimento reportado en este trabajo (administraciones pre-entrenamiento en el NAcS, Figura 13), dichos datos presentan cuestiones semejantes a las del experimento discutido en la sección anterior. Es decir, que la prueba ANOVA arroja un estadístico apenas mayor ( $p = 0.52$ ) al nivel de significancia ( $p = 0.5$ ). También en este experimento se puede observar que los grupo de animales operados (AEA y vehículo) tienen una disminución visible (aunque no significativa) con respecto al grupo de

---

animales intactos, por lo que existe la posibilidad de que dicha disminución de los grupos implantados con cánulas se deba a un efecto del procedimiento quirúrgico. Sin embargo, en este experimento se aprecia que el grupo AEA no difiere significativamente del grupo vehículo, tal como se confirma por el análisis t entre ambos grupos ( $t_{22} = -0.063$ ,  $p = 0.950$ ).

Debido a la ausencia de diferencias en todas las pruebas estadísticas empleadas, concluimos que el sistema endocannabinérgico en el NAcS no participa en la adquisición del miedo condicionado a un contexto.

La evidencia obtenida en nuestro trabajo es concordante con datos reportados previamente. Específicamente, nuestra evidencia es compatible con los datos de Riedel et al. (1997; mencionado en la introducción). Estos autores encuentran que las lesiones del NAc interfieren con el condicionamiento del miedo contextual, pero no a una señal auditiva. Las coordenadas para la colocación de los electrodos que reportan Riedel et al. (1997) corresponden al NAcC (aunque la ubicación específica de las lesiones en alguna de las subregiones del NAc no fue un factor a considerar por estos investigadores).

Otro estudio cuyos datos van en línea con nuestra evidencia es el trabajo de Levita et al. (2002). En este estudio, como ya ha sido discutido previamente en otras secciones, la lesión del NAcC interrumpe tanto la adquisición como la consolidación del miedo contextual. Se sabe también, por ejemplo, que la liberación de dopamina se incrementa significativamente en el NAcC, pero no en el NAcS, cuando una rata es re-expuesta al contexto donde recibió descargas eléctricas (Pezze et al., 2001). Estos estudios apoyan una regulación del NAc en la formación de la memoria del miedo condicionado a un contexto y, además, que esta regulación se lleva a cabo mediante un mecanismo dopaminérgico. Nuestro estudio es importante puesto que es el primero que muestra que también el sistema endocannabinérgico en el NAcC es importante para la adquisición del miedo

---

---

condicionado a un contexto. Más adelante se retoma este resultado para enmarcarlo en una interpretación más global de todos los experimentos de esta tesis.

La siguiente cuestión a discutir es la razón por la cual sólo el miedo condicionado contextual se afectó, pero no el miedo condicionado a la señal auditiva.

### 9.5. Condicionamiento al contexto contra condicionamiento a la señal auditiva

Como muestra la Figura 11, la activación del receptor CB1 en el NAcC antes del entrenamiento en el condicionamiento de miedo a una señal auditiva no interfiere significativamente con el aprendizaje de la tarea.

En el panel A de la Figura 11 se muestra el congelamiento que tuvieron los animales durante el primer minuto de estancia en la caja de prueba. Como ya se mencionó, dicha caja de prueba fue distinta a la caja de entrenamiento (sección 7.4, Figura 6). La gráfica aludida muestra que las ratas no identifican esa caja de prueba como un lugar peligroso. Esta observación es importante, puesto que descarta la posibilidad de que los animales generalicen la caja A (entrenamiento) a la caja B (prueba), de forma que la caja B provoque que los animales muestren miedo, dificultando la interpretación de los resultados experimentales. A pesar de que se observa un incremento en el congelamiento de los animales intactos con respecto a los demás, dicho incremento no es significativo.

En el panel B se observa el congelamiento que mostraron los grupos de ratas durante la presentación de los tonos. Es decir, en dicha gráfica se muestra únicamente el congelamiento de los animales durante la presentación de los tonos, excluyendo por tanto cualquier congelamiento mostrado fuera de la duración de los tonos.

En esa misma figura se observa, en primer lugar, que no difiere el comportamiento de los grupos entre sí con el paso de los ensayos (tonos). Es decir, que la activación del receptor CB1 en el NAcC antes del entrenamiento no modifica significativamente el aprendizaje de las ratas. Por lo tanto, el sistema endocannabinérgico en el NAcC no parece modular el aprendizaje del miedo condicionado a una señal auditiva.

El anterior resultado es consistente con lo hallado en la literatura. Por ejemplo, Riedel et al. (1997) tampoco encuentran que las lesiones del NAcC alteren significativamente la conducta de los animales en el miedo condicionado a una señal auditiva (Riedel et al., 1997). De forma semejante, Levita et al. (2002) tampoco encuentran interferencias con el aprendizaje del miedo condicionado a la señal auditiva cuando lesionaron el NAcC de sus ratas (Levita et al., 2002). De forma importante, en otro estudio reciente (McDannald y Galarce, 2011), las lesiones excitotóxicas del NAcC hechas antes del entrenamiento en el condicionamiento del miedo a una señal auditiva no tuvieron ningún efecto en el aprendizaje de la tarea (McDannald y Galarce, 2011). Por lo tanto, el que en esta tesis no se haya encontrado un efecto por la activación del receptor CB1 en el NAcC es consistente con lo ya reportado en otros estudios.

Una consecuencia importante de los datos mostrados en la Figura 11 es que la activación del receptor CB1 en el NAcC no interfiere ni con la valencia del aprendizaje, ni con el estímulo incondicionado (descargas). En el primer caso, si AEA cambiara la valencia del aprendizaje, haciéndolo pasar de negativo (aversivo) a positivo (apetitivo, o reforzante), ambos tipos de condicionamiento (contextual y a la señal auditiva) deberían verse alterados. Esto, evidentemente no sucede. Esta conclusión es semejante a la que puede derivarse de la posible interferencia de la activación del receptor CB1 con la percepción del dolor. Si el CB1 interfiere con la información del dolor, entonces, nuevamente, ambos condicionamientos debieron verse alterados. Por lo tanto,

resulta razonable suponer que el efecto de la activación del receptor CB1 en el NAcC interfiere con la información del EC (contexto contra tono). Esta idea se retoma en la última sección de esta discusión, para integrarla en una interpretación más general.

Ahora bien, no obstante que no se observaron diferencias entre los grupos en relación con el congelamiento mostrado en cada uno de los tonos durante la prueba de memoria, dichas diferencias sí se hallaron entre los diferentes tonos a lo largo de la sesión de prueba, independientemente del grupo experimental. Específicamente, los tonos intermedios son significativamente diferentes de los últimos tonos (es decir, los tonos del 3-4 al 7-8 son diferentes de los tonos 15-16 al 19-20). Esto puede explicarse como un fenómeno de extinción. Así, a la mitad de la prueba de memoria los tonos aún les advierten a las ratas que un daño físico (las descargas eléctricas) puede hacerse presente. Para el final de la sesión, las ratas ya han aprendido en cierto grado que dichos tonos ya no van acompañados de descargas, por lo que las respuestas de miedo (congelamiento) de las ratas van disminuyendo.

La interferencia con el aprendizaje inducida por la activación del receptor CB1 podría ser debida a que se interrumpe la comunicación normal del NAc con otras estructuras del sistema neural del miedo. Esta hipótesis, y la evidencia relativa que se obtuvo en esta tesis, se discuten a continuación.

#### 9.6. El efecto de la coadministración de glutamato con AEA

Como se mencionó en la introducción de este trabajo (sección 3.2), el sistema endocannabinérgico se encuentra de forma importante en sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas. Debido a que la administración de un endocanabinoide redujo significativamente el miedo contextual condicionado, se presenta la posibilidad de que esta reducción en el aprendizaje sea

debida a la inhibición de las sinapsis glutamatérgicas en el NAc. Lo anterior por los motivos expuestos a continuación.

Dos de las estructuras más importantes para el miedo contextual condicionado (amígdala e hipocampo) envían proyecciones al NAc. Para el caso de la amígdala, la gran mayoría de neuronas de esta estructura son glutamatérgicas (más del 70% del total de neuronas que constituyen a la BLA, principal fuente de aferencias al NAc, son neuronas espinosas piramidales I; Sah et al., 2003). Christie, Summers, Stephenson, Cook & Beart (1987) demostraron (mediante administraciones de aspartato radioactivo) que las proyecciones BLA-NAc son, de hecho, glutamatérgicas (Christie et al., 1987). Resultados similares fueron obtenidos por Fuller, Russchen & Price (1987).

Las proyecciones glutamatérgicas amígdala-NAc influyen en la excitabilidad de este último, como lo demostraron por primera vez Yim y Mogenson (1982) al estimular eléctricamente la BLA en ratas anestesiadas. La estimulación de la BLA produjo respuestas excitadoras significativas en el NAc (Yim & Mogenson, 1982). Este fenómeno es confirmado por estudios más recientes como el de Stuber et al. (2011). Estos autores identificaron células glutamatérgicas en la amígdala, cuyos axones viajan al NAc. Al estimular optogenéticamente estas proyecciones, observaron un aumento en la excitabilidad del NAc. Las respuestas excitadoras observadas en el NAc fueron bloqueadas con un antagonista (CNQX) de los receptores AMPA, demostrando que dichas aferencias son glutamatérgicas (Stuber et al., 2011).

Para el caso del hipocampo, las neuronas del subículo hipocampal (región de donde parten la mayoría de las aferencias al NAc) son piramidales, por lo que dichas células son glutamatérgicas. Fuller et al. (1987), administrando aspartato radioactivo, concluyeron que las proyecciones hipocampo-NAc son de naturaleza glutamatérgica (Fuller et al., 1987). Britt, Benaliouad, McDevitt,

---

Stuber, Wise y Monci (2012) confirmaron más recientemente la naturaleza glutamatérgica de las proyecciones hipocampo-NAc. Estos autores administraron un trazador fluorescente en neuronas de proyección en el hipocampo, observando que dichas células envían proyecciones al NAc. Cuando estimularon optogenéticamente dichas neuronas, obtuvieron respuestas excitadoras significativas en neuronas espinosas medianas del NAc (Britt et al., 2012).

En resumen, la activación del receptor CB1 inhibe la liberación de neurotransmisor en sinapsis glutamatérgicas (entre otras). Tanto la amígdala y el hipocampo envían proyecciones excitadoras hacia el NAc, e influyen en la excitabilidad de esta estructura. Si el NAc forma parte del circuito que permite el aprendizaje del miedo a un contexto, y la activación del CB1 interfiere con dicho aprendizaje, es posible que la activación del CB1 (lograda en esta tesis con la administración exógena de AEA) interrumpa la comunicación amígdala-NAc e hipocampo-NAc, de forma tal que el circuito antes mencionado no funcione de forma apropiada. Esa fue la idea detrás de la coadministración de glutamato y AEA: ‘restituir’ el supuesto glutamato que deja de liberarse con la activación farmacológica del CB1 para revertir el efecto de AEA.

La dosis de glutamato (3.5 mM) administrada corresponde a las concentraciones halladas en el NAc por medio de electroforesis capilar (en trabajos, no publicados, realizados en nuestro laboratorio). Como se puede ver en la Figura 15, dicha dosis de glutamato revierte la interferencia en el miedo condicionado lograda con AEA. Este resultado parece apoyar la hipótesis de que la activación del CB1 interfiere en el condicionamiento al inhibir las aferencias glutamatérgicas al NAc.

Sin embargo, esta interpretación ha de tomarse con cautela, debido a que no se comprobó la ausencia de toxicidad inducida por la administración de glutamato.



A pesar de que en los cortes de cerebros de animales administrados con glutamato no se observaron lesiones evidentes en el tejido, esta observación de ninguna forma excluye la posibilidad de una alteración en la función del tejido nervioso. Es decir, usando métodos histológicos tradicionales (como tinción de Nissl) una lesión excitotóxica es evidente bajo el microscopio sólo algunos días (menos de una semana) después de la cirugía. Después de una semana, se vuelve difícil determinar la presencia y extensión de una lesión neurotóxica, porque no es posible diferenciar neuronas pequeñas (si aún existen) de las células gliales que invaden el sitio de la lesión (Jongen-Rêlo & Feldon, 2002). Como consecuencia, la tinción de Nissl no basta para determinar si hubo muerte de neuronas por excitotoxicidad. Debido a que en nuestro trabajo sólo se observaron los cortes de cerebro mediante la mencionada técnica de Nissl, y dichas observaciones se hicieron por lo menos dos semanas después de la administración de los fármacos, no existe la certeza de que no se hayan lesionado a las neuronas del NAcC.

Dicha incertidumbre se podría remediar empleando alguna técnica que permita identificar específicamente neuronas, como por ejemplo la inmunohistoquímica contra la proteína nuclear específica de neuronas (“neuron-specific nuclear protein”, o NeuN; Jongen-Rêlo & Feldon, 2002). Sin embargo, como ya se mencionó, esta comprobación no se realizó.

Suponiendo que, efectivamente, la administración de glutamato provocó neurotoxicidad, se esperaría observar un efecto semejante al de Riedel et al. (1997), o al de Levita et al. (2002): una clara interferencia con el aprendizaje de la tarea. Sin embargo, dicho resultado no sólo no se observa, sino que el claro efecto disruptivo de AEA encontrado en esta tesis se revierte. Es decir, aunque no es posible afirmar con certeza que no existió neurotoxicidad con las administraciones de glutamato, la evidencia sugiere que no fue así. Solamente nueva evidencia experimental, en la

---

---

cual se analice el posible efecto neurotóxico del glutamato en el tejido nervioso, podría traer la certeza que en estos experimentos no fue lograda.

Finalmente es preciso explicar cuáles son las implicaciones de una regulación canabinérgica del NAcC en el aprendizaje del miedo condicionado a un contexto, y qué significa esta regulación en el contexto del funcionamiento cerebral durante dicho aprendizaje.

### 9.7. El NAc como codificador de contextos, y el sistema endocanabinérgico como modulador de dicha codificación

De los datos discutidos en las secciones previas se desprende que, cuando el receptor CB1 se activa en el NAcC, aprender que un lugar es peligroso se entorpece. Este papel del receptor CB1 se limita al aprendizaje, no a la consolidación; por lo tanto, puede no ser un déficit necesariamente en la memoria, sino en el aprendizaje. El papel del CB1 en este aprendizaje se limita al NAcC, no a toda la estructura; por lo tanto, existe una diferenciación funcional del NAc para las tareas espaciales. El papel del CB1 se limita al miedo condicionado contextual, no al miedo condicionado a señales auditivas; por lo tanto, no es factible que el CB1 en el NAcC interfiera con el aprendizaje modificando aspectos motivacionales o hedónicos del mismo. Y existe la posibilidad razonable de que sea, en última instancia, la comunicación excitadora (glutamatérgica) del hipocampo con el NAc la responsable de la correcta codificación de los contextos, por lo que es probable que el efecto de la activación del CB1 en el aprendizaje se deba a interrumpir dicha comunicación.

Si todo lo anterior es cierto, la propuesta central de esta tesis se enfoca, entonces, a que el NAcC es un núcleo importante para tareas espaciales en general, más allá del condicionamiento del miedo a una clave auditiva. Y esta importancia vendría dada por la habilidad de esta subestructura para comunicarse con el hipocampo, y codificar contextos espaciales. Siendo esto así, debe existir evidencia que apoye dicha propuesta. Esta evidencia se analiza a continuación.

### 9.7.1. La relación NAc-hipocampo

Como ya se describió brevemente en la introducción de esta tesis, el NAc y el hipocampo se relacionan anatómicamente y funcionalmente. Con respecto a dicha relación funcional, O'Donnell & Grace (1995) hallaron que las neuronas del NAc mantienen un potencial de reposo bifásico, consistente en un voltaje de aproximadamente -77 mV ("down-state") que es interrumpido por mesetas de voltaje de alrededor de -63 mV ("up-state"; O'Donnell & Grace, 1995). Está demostrado que las transiciones de "down-state" a "up-state" están determinadas por las aferencias excitadoras del hipocampo (O'Donnell & Grace, 1995; Goto & Grace, 2008), y es sólo durante esos "up-states" que las neuronas del NAc producen potenciales de acción (O'Donnell, Greene, Pabello, Lewis & Grace, 1999). La evidencia anterior indica que el hipocampo mantiene una comunicación con el NAc de especial relevancia para la excitabilidad de este último, por lo que la idea de que ambas estructuras mantienen un contacto estrecho y relevante para las tareas espaciales se ve reforzada.

En concordancia con los datos anteriores se encuentra el reporte de Gill y Grace (2011), quienes hallaron que las respuestas excitadoras que se producen en el NAc como consecuencia de la estimulación de la amígdala (la BLA, en concreto) se atenúan significativamente con la inactivación del hipocampo (el subículo ventral, región de donde parte la mayoría de las proyecciones del hipocampo hacia el NAc) (Gill & Grace, 2011). Este fenómeno resulta lógico y consecuente si se considera que French y Totterdell (2003) ya demostraron que las proyecciones del subículo ventral y de la BLA convergen en las mismas espinas dendríticas de las neuronas del NAc (French & Totterdell, 2003).

Es decir, la evidencia arriba comentada apunta a que el hipocampo mantiene una regulación sobre la excitabilidad del NAc. Esta idea adquiere especial relevancia, si se mantiene presente que la propuesta central de esta tesis es, precisamente, que el NAc trabaja en coordinación con el hipocampo para codificar el contexto que ha de ser asociado con las descargas eléctricas (o cualquier otro contexto). De forma más específica, que el NAcC forma parte de un circuito que codifica los contextos espaciales, y que esta función depende de forma muy importante de las aferencias excitadoras que provienen del mismo hipocampo hacia el NAc.

Hay más evidencia que apoya la idea anteriormente expresada:

- La lesión del NAc interfiere con el aprendizaje de dos tareas espaciales (ambas, dependientes de hipocampo): el laberinto acuático de Morris y el laberinto T (Annett, McGregor & Robbins, 1989),
- Algunos estudios han hallado ‘células de lugar’ en el NAc. Lavoie y Mizumori (1994) registraron neuronas individuales del NAc en animales mientras éstos resolvían el laberinto radial de 8 brazos, encontrando varias células de lugar en el NAc. De forma semejante, Martin y Ono (2000) encontraron células de lugar en el NAc (y en el subículo) en ratas sujetas a una tarea de búsqueda continua de reforzador (donde el reforzador era encontrado en un lugar siempre diferente dentro de una arena circular (Martin & Ono, 2000).
- Ferretti, Sargolini, Oliverio, Mele y Roulet (2007) administraron un antagonista (AP-5) del receptor NMDA, o un antagonista (CNQX) del receptor AMPA en el NAc de ratones que fueron entrenados en el laberinto de Morris. Los ratones administrados con fármaco mostraron una ejecución deficiente en dicha tarea durante la fase de prueba (Ferretti et al., 2007).

El estudio de Ferretti et al. (2007) es particularmente importante puesto que demuestra que, interrumpidas las aferencias excitadoras del hipocampo al NAc, el aprendizaje de tareas espaciales dependientes de hipocampo se interrumpe. Este resultado apoya los resultados obtenidos en la presente tesis. La diferencia de los datos de Ferretti et al. (2007) con los aquí reportados radica en que, en esta tesis, las mencionadas aferencias glutamatérgicas se inhibieron, presumiblemente, a través de la activación del receptor CB1.

Por lo tanto, la propuesta central de esta tesis, a la luz de los experimentos realizados y el análisis de estos últimos hecho, es que el NAc es parte de un circuito neural que permite la codificación de contextos. Debido a que el receptor CB1, abundantemente presente en el NAc, es capaz de inhibir las aferencias excitadoras a este núcleo estriatal, y a que la inhibición de dichas aferencias hipocampales interfiere con el aprendizaje de tareas espaciales, se concluye que el sistema endocannabinérgico es un sistema neuroquímico, presente en el NAc, que puede modular al aprendizaje del miedo condicionado a un contexto al interferir específicamente con la codificación de ese contexto, mas no con la asociación de los estímulos, o con algún otro aspecto motivacional, hedónico o nociceptivo de dicho aprendizaje.

## 9.8. Conclusiones

- a) El receptor CB1 en el NAcC es capaz de regular el aprendizaje del miedo condicionado a un contexto, de forma tal que la activación de dicho receptor impide, o interfiere, con la tarea mencionada.
  
- b) Dicha interferencia se lograría por la inhibición de las aferencias excitadoras, hipocampales, al NAcC. De esta forma, la evidencia de esta tesis apoya un papel del NAcC como parte del circuito que codifica contextos. La evidencia no permite apoyar la noción de que el sistema endocannabinérgico en el NAcC participe en la consolidación del miedo condicionado a un contexto.
  
- c) El receptor CB1 en el NAcC no interfiere con el miedo condicionado a la señal auditiva, por lo que se descarta que afecte la percepción de dolor, o el valor hedónico de la tarea. Asimismo, se descarta que el efecto producido por AEA se deba a la activación de otro receptor distinto al CB1.

---

## 10. Referencias

1. Ahn, K.H., Bertalovitz, A.C., Mierke, D.F. & Kendall, D.A. (2009). Dual role of the second extracellular loop of the cannabinoid receptor 1: ligand binding and receptor localization. *Molecular Pharmacology*, 76 (4): 833-842.
2. Akirav, I. (2011). The role of endocannabinoids in modulating emotional and non-emotional memory processes in the hippocampus. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5: 34.
3. Alger, B.E. & Kim, J. (2011). Supply and demand for endocannabinoids. *Trends in Neurosciences*, 34 (6): 304-315.
4. Andersen, P., Bliss, T.V.P. & Skrede, K.K. (1970). Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Experimental Brain Research*, 13: 222-238.
5. Annett, L.E., McGregor, A. & Robbins, T.W. (1989). The effects of ibotenic acid lesions of the nucleus accumbens on spatial learning and extinction in the rat. *Behavioural Brain Research*, 31: 231-242.
6. Antoniadis, E.A. & McDonald, R.J. (1999). Discriminative fear conditioning to context expressed by multiple measures of fear in the rat. *Behavioural Brain Research*, 101 (1): 1-13.
7. Atwood, B.K. & Mackie, K (2010). CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *British Journal of Pharmacology*, 160: 467-479.
8. Badrinarayan, A., Wescott, S.A., Vander Weele, C.M., Saunders, B.T., Couturier, B.E., Maren, S. & Aragona, B.J. (2012). Aversive stimuli differentially modulate real-time dopamine transmission dynamics within the nucleus accumbens core and shell. *Journal of Neuroscience*, 32 (45): 15779-15790.
9. Bandler, R., Depaulis, A. & Vergnes, M. (1985). Identification of midbrain neurones mediating defensive behavior in the rat by microinjections of excitatory amino acids. *Behavioural Brain Research*, 15 (2): 107-119.
10. Basavarajappa, B.S. (2007). Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein and Peptide Letters*, 14 (3): 237-246.
11. Bassareo, V., De Luca, M.A. & Di Chiara, G. (2002). Differential expression of motivational stimulus properties by dopamine in nucleus accumbens shell versus core and prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*, 22 (11): 4709-4719.

12. Battista, N., Di Tommaso, M., Bari, M. & Maccarrone, M. (2012). The endocannabinoid system: an overview. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6: 9.
13. Bisogno, T., Berrendero, F., Ambrosino, G., Cebeira, M., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J. & Di Marzo, V. (1999). Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 256: 377-380.
14. Blanchard, R.J. & Blanchard, D.C. (1969). Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 68 (1): 129-135.
15. Blanchard, D.C. & Blanchard, R.J. (1972). Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 81 (2): 281-290.
16. Blanchard, D.C., Fukunaga, K.K. & Blanchard, D.C. (1976). Environmental control of defensive reactions to footshock. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 8: 129-130.
17. Bolles, R.C. (1970). Species-specific defense reactions and avoidance learning. *Psychological Review*, 77 (1): 32-48.
18. Britt, J.P., Benaliouad, F., McDevitt, R.A., Stuber, G.D., Wise, R.A. & Bonci, A. (2012). Synaptic and behavioral profile of multiple glutamatergic inputs to the nucleus accumbens. *Neuron*, 76 (4): 790-803.
19. Carlezon, J.W. (Jr.), Mendrek, A. & Wise, R.A. (1995). MK-801 disrupts the expression but not the development of bromocriptine sensitization: a state-dependency interpretation. *Synapse*, 20 (1): 1-9.
20. Chaudhury, D. & Colwell, C.S. (2002). Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice. *Behavioural Brain Research*, 133 (1): 95-108.
21. Christie, M.J., Summers, R.J., Stephenson, J.A., Cook, C.J. & Beart, P.M. (1987). Excitatory amino acid projections to the nucleus accumbens septi in the rat: a retrograde transport utilizing D[<sup>3</sup>H]aspartate and [<sup>3</sup>H]GABA. *Neuroscience*, 22 (2): 425-439.
22. Cluny, N.L., Reimer, R.A. & Sharkey, K.A. (2012). Cannabinoid signaling regulates inflammation and energy balance: the importance of the brain-gut axis. *Brain, Behavior and Immunity*, 26 (5): 691-698.
23. Console-Bram, L., Marcu, J. & Abood, M.E. (2012). Cannabinoid receptors: nomenclature and pharmacological principles. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 38 (1): 4-15.



24. Davis, M., Rainnie, D. & Cassell, M. (1994). Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends in Neurosciences*, 17 (5): 208-214.
25. DeFelipe, J., Fernández-Gil, M.A., Kastanauskaite, A., Palacios Bote, R., Gañán Presmanes, Y. & Trinidad Ruiz, M. (2007). Macroanatomy and microanatomy of the temporal lobe. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 28 (6): 404-415.
26. Demuth, D.G. & Molleman, A. (2006). Cannabinoid signaling. *Life Sciences*, 78 (6): 549-563.
27. Devane, W.A., Dysarz, F.A., Johnson, M.R., Melvin, L.S. & Howlett, A.C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in the rat brain. *Molecular Pharmacology*, 34 (5): 605-613.
28. Devane, W.A., Hanuš, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. & Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258 (5090): 1946-1949.
29. Di Marzo, V., De Petrocellis, L. & Bisogno, T. (2005). The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids, en Pertwee, R.G. (ed.). Handbook of experimental pharmacology: Vol. 168. Cannabinoids (pp 147-185). Berlin: Springer.
30. Estes, W.K. & Skinner, B.F. (1941). Some quantitative properties of anxiety. *Journal of Experimental Psychology*, 29 (5): 390-400.
31. Fanselow, M.S. (1980). Conditional and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlovian Journal of Biological Science*, 15 (4): 177-182.
32. Fanselow, M.S. (1982). The postshock activity burst. *Animal Learning and Behavior*, 10 (4): 448-454.
33. Fanselow, M.S. (1994). Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychonomic Bulletin and Review*, 1 (4): 429-438.
34. Fanselow, M.S. (2000). Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behavioural Brain Research*, 110 (1-2): 73-81.
35. Felder, C.C., Briley, E.M., Axelrod, J., Simpson, J.T., Mackie, K. & Devane, W.A. (1993). Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (16): 7656-7660.
36. Fenu, S., Bassareo, V. & Di Chiara, G. (2001). A role for dopamine D1 receptors of the nucleus accumbens shell in conditioned taste aversion learning. *Journal of Neuroscience*, 21 (17): 6897-6904.

37. Fu, J., Bottegoni, G., Sasso, O., Bertorelli, R., Rocchia, W., Masetti, M., Guijarro, A., Lodola, A., Armirotti, A., Garau, G., Bandiera, T., Reggiani, A., Mor, M., Cavalli, A. & Piomelli, D. (2012). A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nature Neuroscience*, 15 (1): 64-71.
38. Fuller, T.A., Russchen, F.T. & Price, J.L. (1987). Sources of presumptive glutamatergic/aspartergic to the rat ventral striatopallidal region. *Journal of Comparative Neurology*, 258 (3): 317-338.
39. Gatley, S.J., Gifford, A.N., Volkow, N.D., Lan, R. & Makriyannis, A. (1996). <sup>123</sup>I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors. *European Journal of Pharmacology*, 307 (3): 331-338.
40. Gatley, S.J., Lan, R., Pyatt, B., Gifford, A.N., Volkow, N.D. & Makriyannis, A. (1997). Binding of the non-classical cannabinoid CP 55,940, and the diarylpyrazole AM251 to rodent brain cannabinoid receptors. *Life Sciences*, 61 (14): PL 191-197.
41. Gatley, S.J., Lan, R., Volkow, N.D., Pappas, N., King, P., Wong, C.T., Gifford, A.N., Pyatt, B., Dewey, S.L. & Makriyannis, A. (1998). Imaging the brain marijuana receptor: development of a radioligand that binds to cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors in vivo. *Journal of Neurochemistry*, 70 (1): 417-423.
42. Gill, K.M. & Grace, A.A. (2011). Heterogenous processing of amygdala and hippocampus inputs in the rostral and caudal subregions of the nucleus accumbens. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14 (10): 1301-1314.
43. Golstein, M.L. (1965). Effects of hippocampal, amygdala, hypothalamic and parietal lesions on a classically conditioned fear response. *Psychological Reports*, 16: 211-219.
44. Goto, Y. & Grace, A.A. (2008). Limbic and cortical information processing in the nucleus accumbens. *Trends in Neuroscience*, 31 (11): 552-558.
45. Groenewegen, H.J., Wright, C.I., Beijer, A.V.J. & Voorn, P. (1999). Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877: 49-63.
46. Groenewegen, H.J. (2007). The ventral striatum as an interface between the limbic and motor systems. *CNS Spectrums*, 12 (12): 887-892.
47. Hamilton, R.B., Ellenberger, H., Liskowsky, D. & Schneiderman, N. (1981). Parabrachial area as mediator of bradychardia in rabbits. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 4 (3): 261-281.

48. Hanuš, L., Abu-Lafi, S., Frider, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D.E., Kustanovich, I. & Mechoulam, R. (2001). 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (7): 3662-3665.
49. Haralambous, T. & Westbrook, R.F. (1999). An infusion of bupivacaine into the nucleus accumbens disrupts the acquisition but not the expression of contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 113 (5): 925-940.
50. Heinbockel, T., Brager, D.H., Reich, C.G., Zhao, J., Muralidharan, S., Alger, B.E. & Kao, J.P.Y. (2005). Endocannabinoid signaling dynamics probed with optical tools. *Journal of Neuroscience*, 25 (41): 9449-9459.
51. Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R. & Rice, K.C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87: 1932-1936.
52. Herkenham, M., Lynn, A.B., de Costa, B.R. & Richfield, E.K. (1991a). Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Research*, 547: 267-274.
53. Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R. & Rice, K.C. (1991b). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative *in vitro* autoradiographic study. *Journal of Neuroscience*, 11 (2): 563-583.
54. Hernandez, P.J., Sadeghian, K. & Kelley, A.E. (2002). Early consolidation of instrumental learning requires protein synthesis in the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*, 5 (12): 1327-1331.
55. Hillard, C.J., Edgemond, W.S., Jarrahian, A. & Campbell, W.B. (1997). Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *Journal of Neurochemistry*, 69: 631-638.
56. Howlett, A.C., Reggio, P.H., Childers, S.R., Hampson, R.E., Ulloa, N.M. & Deutsch, D.G. (2011). Endocannabinoid tone versus constitutive activity of cannabinoid receptors. *British Journal of Pharmacology*, 163: 1329-1343.
57. Huang, S.M., Bisogno, T., Trevisani, M., Al-Hayani, A., De Petrocellis, L., Fezza, F., Tognetto, M., Petros, T.J., Krey, J.F., Chu, C.J., Miller, J.D., Davies, S.N., Geppeti, P., Walker, J.M. & Di Marzo, V. (2002). An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (12): 8400-8405.

- 
- 
58. Johansen, J.P., Cain, C.K., Ostroff, L.E. & LeDoux, J.E. (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, 147: 509-524.
  59. Jongen-Rêlo, A.L. & Feldon, J. (2002). Specific neuronal protein: a new tool for histological evaluation of excitotoxic lesions. *Physiology and Behavior*, 76 (4-5): 449-456.
  60. Kalish, H.I. (1954). Strength of fear as a function of the number of acquisition and extinction trials. *Journal of Experimental Psychology*, 47 (1): 1-9.
  61. Kandel, E.R. & Squire, L.R. (2009). Memory. From mind to molecules. Greenwood Village, E.U.A: *Roberts & Company*.
  62. Katona, I. (2009). Endocannabinoid receptors: CNS localization of the CB1 cannabinoid receptor. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 1: 65-86.
  63. Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Augood, S.J. & Emson, P.C. (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neuroscience*, 18: 527-535.
  64. Kellicutt, M.H. & Schwartzbaum, J.S. (1963). Formation of a conditioned emotional response (CER) following lesions of the amygdala complex in rats. *Psychological Reports*, 12: 352-358.
  65. Klüver, H. & Bucy, P.C. (1937). "Psychic blindness" and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. *American Journal of Physiology*. 119 (2): 352-353.
  66. Krieger, J.E. & Graeff, F.G. (1985). Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 18 (1): 61-67.
  67. Kudolo, J., Tabassum, H., Frey, S., López, J., Hassan, H., Frey, J.U. & Bergado, J.A. (2010). Electrical and pharmacological manipulations of the nucleus accumbens core impair synaptic plasticity in the dentate gyrus of the rat. *Neuroscience*, 168 (3): 723-731.
  68. Lang, P.J., Davis, M. & Öhman, A. (2000). Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. *Journal of Affective Disorders*, 61: 137-159.
  69. LeDoux, J.E. (1996). The emotional brain. The mysterious underpinnings of emotional life. New York: *Simon & Schuster*.
  70. LeDoux, J.E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, 23: 155-184.
  71. LeDoux, J.E. (2007). The amygdala. *Current Biology*, 17 (20): R868-R874.

- 
- 
72. LeDoux, J.E., Iwata, J., Cicchetti, P. & Reis, D.J. (1988). Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *Journal of Neuroscience*, 8: 2517-2529.
  73. Levita, L., Dalley, J.W. & Robbins, T.W. (2002). Disruption of pavlovian contextual conditioning by excitotoxic lesions of the nucleus accumbens core. *Behavioral Neuroscience*, 116: 539-552.
  74. Li, M & Fleming, A.S. (2003). Differential involvement of nucleus accumbens shell and core subregions in maternal memory in postpartum female rats. *Behavioral Neuroscience*, 117 (3): 426-445.
  75. Ligresti, A., Morera, E., van der Stelt, M., Monory, K., Lutz, B., Ortar, G. & Di Marzo, V. (2004). Further evidence for the existence of a specific process for the membrane transport of anandamide. *The Biochemical Journal*, 380 (Pt 1): 265-272.
  76. Liu, X., Ramirez, S., Pang, P.T., Puryear, C.B., Govindarajan, A., Deisseroth, K. & Tonegawa, S. (2012). Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature*, 484 (7394): 381-385.
  77. López, J., Almaguer, W., Pérez, H., Frey, J.U. & Bergado, J.A. (2008). Opposite effects of shell and core stimulation of the nucleus accumbens on long-term potentiation in dentate gyrus of anesthetized rats. *Neuroscience*, 151 (2): 572-578.
  78. López-Antúnez, L. (1979). Anatomía funcional del sistema nervioso. *Limusa: México*.
  79. Lovinger, D.M. (2008). Presynaptic modulation by endocannabinoids. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 184: 435-477.
  80. Maldonado-Irizarry, C.S. & Kelley, A.E. (1994). Differential behavioral effects following microinjection of an NMDA antagonist into nucleus accumbens subregions. *Psychopharmacology*, 116 (1): 65-72.
  81. Maren, S., (2001). Neurobiology of pavlovian fear learning. *Annual Review of Neuroscience*, 24: 897-931.
  82. Maren, S., (2008). Pavlovian fear conditioning as a behavioral assay for hippocampus and amygdale function: cautions and caveats. *European Journal of Neuroscience*, 28: 1661-1666.
  83. Maren, S. (2011). Seeking a spotless mind: extinction, deconsolidation, and erasure of fear memory. *Neuron*, 70: 830-845.

- 
- 
84. Maren, S. & Fanselow, M.S. (1997). Electrolytic lesions of the fimbria/fornix, dorsal hippocampus or entorhinal cortex produce anterograde deficits in contextual fear conditioning in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 67: 142-149.
  85. Maren, S., Phan, K.L. & Liberzon, I. (2013). The contextual brain: implications for fear conditioning extinction and psychopathology. *Nature Reviews Neuroscience*, 14 (6): 417-428.
  86. Marsch, R., Foeller, E., Rammes, G., Bunck, M., Kössl, M., Holsboer, F., Zieglgänsberger, W., Landgraf, R., Lutz, B. & Wotjak, C.T. (2007). Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. *Journal of Neuroscience*, 27 (4): 832-839.
  87. Marsicano, G., Wotjak, C.T., Azad, S.C., Rammes, G., Cascio, M.G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglgänsberger, W., Di Marzo, V. & Lutz, B. (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*, 418 (6897): 530-534.
  88. Martin, J.H. (1998). Neuroanatomía. México: Prentice-Hall.
  89. Matsuda, L.S., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C. & Bonner, T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346 (6284): 561-564.
  90. Mátyás, F., Watanabe, M., Mackie, K., Katona, I. & Freund, T.F. (2007). Molecular architecture of the cannabinoid signaling system in the core of the nucleus accumbens. *Ideggyógyászati Szemele*, 60 (3-4): 187-191.
  91. McDannald, M.A. & Galarce, E.M. (2011). Measuring pavlovian fear with conditioned freezing and conditioned suppression reveal different roles for the basolateral amygdala. *Brain Research*, 1374: 82-89.
  92. Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanuš, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, A.R., Martin, B.R., Compton, D.R., Pertwee, R.G., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J. & Vogel, Z. (1995). Identification of an endogenous 2-monoacylglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 50 (1): 83-90.
  93. Mechoulam, R. & Parker, L.A. (2012). The endocannabinoid system and the brain. *Annual Review of Psychology*, 64: 21-47.

- 
- 
94. Méndez-Díaz, M., Herrera-Solís, A., Soria-Gómez, E.J., Rueda-Orozco, P.E. & Prospéro-García, O. (2008). Mighty cannabinoids: a potential pharmacological tool in medicine, en: Méndez-Ubach, M & Mondragón-Ceballos, R., (Eds.). Neural mechanisms of drugs of abuse and natural reinforcers (pp.137-157). Kerala, India: *Research Signpost*.
  95. Meredith, G.E., Baldo, B.A., Andrezjewski, M.E. & Kelley, A.E. (2008). The structural basis for mapping behavior onto the ventral striatum and its subdivisions. *Brain Structure and Function*, 213 (1-2): 17-27.
  96. Meyer, A. (1970). Karl Friedrich Burdach and his place in the history of neuroanatomy. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 33 (5): 553-561.
  97. Mineka, S. & Öhman, A. (2002). Phobias and preparedness: the selective, automatic, and encapsulated nature of fear. *Biological Psychiatry*, 52: 927-937.
  98. Mogenson, G.J., Jones, D.L. & Yim, C.Y. (1980). From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in Neurobiology*, 14 (2-3): 69-97.
  99. Moser, E.I., Kropff, E. & Moser, M.B. (2008). Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annual Review of Neuroscience*, 31: 69-89.
  100. Munro, S., Thomas, K.L. & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365 (6441): 61-65.
  101. Musty, R. (2005). Cannabinoids and anxiety, en: Mechoulam, R. (Ed.). Cannabinoids as therapeutics. (pp. 141-148). Berlín: *Birkhäuser*.
  102. Núñez-Jaramillo, L., Rangel-Hernández, J.A., Burgueño-Zúñiga, B. & Miranda, M.I. (2012). Activation of nucleus accumbens NMDA receptors differentially affects appetitive or aversive taste learning and memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6: 13.
  103. O'Donnell, P. & Grace, A.A. (1995). Synaptic interactions among excitatory afferents to nucleus accumbens neurons: hippocampal gating of prefrontal cortical input. *Journal of Neuroscience*, 15 (5): 3622-3639.
  104. O'Donnell, P., Greene, J., Pabello, N., Lewis, B.L. & Grace, A.A. (1999). Modulation of cell firing in the nucleus accumbens. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877: 157-175.
  105. O'Keefe, J. & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely –moving rat. *Brain Research*, 34: 171-175.
  106. Odling-Smee, F.J. (1975). The role of background stimuli during pavlovian conditioning. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 27 (2): 201-209.

- 
- 
107. Orsini, C.A. & Maren, S. (2012). Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36 (7): 1773-1802.
108. Pamplona, F.A. & Takahashi, R.N. (2006). WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Neuroscience Letters*, 397 (1-2): 88-92.
109. Pavlov, I.P. (1927). Conditioned reflexes. An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. Londres: *Oxford University Press*.
110. Paxinos, G. & Watson, C. (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates. (6a ed.). Amsterdam: *Elsevier*.
111. Pedroza-Llinás, R., Ramírez-Lugo, L., Guzmán-Ramos, K., Zavala-Vega, S. & Bermúdez-Rattoni, F. (2009). Safe taste memory consolidation is disrupted by a protein synthesis inhibitor in the nucleus accumbens shell. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92 (1): 45-52.
112. Pertwee, R.G. (2005). Pharmacological actions of cannabinoids, en Pertwee, R.G. (ed.). Handbook of experimental pharmacology: Vol. 168. Cannabinoids (pp 1-51). Berlin: *Springer*.
113. Petrovich, G.D. & Swanson, L.W. (1997). Projections from the lateral part of the central amygdalar nucleus to the postulated fear conditioning system. *Brain Research*, 763 (2): 247-254.
114. Pezze, M.A., Heidbreder, C.A., Feldon, J. & Murphy, C.A. (2001). Selective responding of nucleus accumbens core and shell dopamine to aversively conditioned contextual and discrete stimuli. *Neuroscience*, 108 (1): 91-102.
115. Phillips, P.E., Stuber, G.D., Heien, M.L., Wightman, R.M. & Carelli, R.M. (2003). Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. *Nature*, 422 (6932): 614-618.
116. Phillips, R.G. & LeDoux, J.E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 106 (2): 274-285.
117. Pickel, V.M., Chan, J., Kearn, C.S. & Mackie, K. (2006). Targeting dopamine D2 and cannabinoid-1 (CB1) receptors in rat nucleus accumbens. *Journal of Comparative Neurology*, 495: 299-313.
118. Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nature Reviews Neuroscience*, 4 (11): 873-884.
119. Pistis, M., Muntoni, A.L., Pillolla, G. & Gessa, G.L. (2002). Cannabinoids inhibit excitatory inputs to neurons in the shell of the nucleus accumbens: an *in vivo* electrophysiological study. *European Journal of Neuroscience*, 15 (11): 1795-1802.



- 
- 
120. Plazcek, E.A., Okamoto, Y., Ueda, N. & Barker, E.L. (2008). Membrane microdomains and metabolic pathways that define anandamide and 2-arachidonyl glycerol biosynthesis and breakdown. *Neuropharmacology*, 55 (7): 1095-1104.
121. Plendl, W. & Wotjak, C.T. (2010). Dissociation of within- and between-session extinction of conditioned fear. *Journal of Neuroscience*, 30 (14): 4990-4998.
122. Porter, A.C., Sauer, J.M., Knierman, M.D., Becker, G.W., Berna, M.J., Bao, J., Nomikos, G.G., Carter, P., Bymaster, F.P., Baker Leese, A. & Felder, C.C. (2002). Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301 (3): 1020-1024.
123. Prensa, L., Richard, S. & Parent, P. (2003). Chemical anatomy of the human ventral striatum and adjacent basal forebrain structures. *Journal of Comparative Neurology*, 460: 345-367.
124. Price, J.L., Russchen, F.T. & Amaral, D.G. (1987). The limbic region II: the amygdaloid complex, en Björklund, A., Hökfelt, T. & Swanson, L.W. (Eds.). Handbook of chemical neuroanatomy, Vol. 5. Integrated systems of the CNS, Part I: hypothalamus, hippocampus, amygdala, retina (pp. 279-388). Amsterdam: Elsevier.
125. Pulvirenti, L., Berrier, R., Kreifeldt, M. & Koob, G.F. (1994). Modulation of locomotor activity by NMDA receptors in the nucleus accumbens core and shell regions of the rat. *Brain Research*, 664 (1-2): 231-236.
126. Ramírez-Lugo, L., Zavala-Vega, S. & Bermúdez-Rattoni, F. (2006). NMDA and muscarinic receptors of the nucleus accumbens have differential effects on taste memory formation. *Learning and Memory*, 13 (1): 45-51.
127. Ray, O.S. & Stein, L. (1959). Generalization of conditioned suppression. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 2: 357-361.
128. Reijmers, L.G., Perkins, B.L., Matsuo, N. & Mayford, M. (2012). Localization of a stable neural correlate of associative memory. *Science*, 317 (5842): 1230-1233.
129. Rescorla, R.A. (1988). Pavlovian conditioning. It's not what you think it is. *American Psychologist*, 43 (3): 151-160.
130. Rescorla, R.A. & Wagner, A.R. (1972). A theory of pavlovian conditioning: variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement, en Black, A.H., Prokasy, W.F. (Eds.). Classical conditioning II: current theory and research (64-99). New York: *Appleton Century Crofts*.

- 
- 
131. Riebe, C.J., Pamplona, F., Kamprath, K. & Wotjak, C.T. (2012). Fear relief-toward a new conceptual frame work and what endocannabinoids gotta do with it. *Neuroscience*, 204: 159-185.
132. Riedel, G., Harrington, N.R., Hall, G. & Macphail, E.M. (1997). Nucleus accumbens lesions impair context, but not cue, conditioning in rats. *Neuroreport*, 8 (11): 2477-2481.
133. Robbe, D., Alonso, G., Duchamp, F., Bockaert, J. & Manzoni, O.J. (2001). Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*, 21 (1): 109-116.
134. Roberts, J.C., Davis, J.B. & Benham, C.D. (2004). [<sup>3</sup>H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV-1 null mice defines TRPV-1 (VR-1) protein distribution. *Brain Research*, 995 (2): 176-183.
135. Ross, R.A. (2003). Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *British Journal of Pharmacology*, 140 (5): 790-801.
136. Rudy, J.W. (2009). Context representations, context functions, and the parahippocampal-hippocampal system. *Learning and Memory*, 16: 573-585.
137. Sah, P., Faber, E.S.L., Lopez de Armentia, M. & Power, M. (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiological Review*, 83: 803-834.
138. Schafe, G.E. & LeDoux, J.E. (2000). Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *Journal of Neuroscience*, 20 (18): RC96.
139. Schwienbacher, I., Fendt, M. & Schnitzler, H.U. (2005). Amphetamine injections into the nucleus accumbens affect neither acquisition/expression of conditioned fear nor baseline startle response. *Experimental Brain Research*, 160 (4): 538-544.
140. Scoville, W.B. & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 20: 11-21.
141. Smart, D., Gunthorpe, M.J., Jerman, J.C., Nasir, S., Gray, J., Muir, A.I., Chambers, J.K., Randall, A.D. & Davis, J.B. (2000). The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor. *British Journal of Pharmacology*, 129 (2): 227-230.
142. Soria-Gómez, E., Matias, I., Rueda-Orozco, P.E., Cisneros, M., Petrosino, S., Navarro, L., Di Marzo, V. & Prospéro-García, O. (2007). Pharmacological enhancement of the endocannabinoid system in the nucleus accumbens shell stimulates food intake and

- increases c-Fos expression in the hypothalamus. *British Journal of Pharmacology*, 151 (7): 1109-1116.
143. Stein, L. & Brady, J.V. (1958). Some effects of two temporal variables on conditioned suppression. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 1 (2): 153-162.
144. Stuber, G.D., Sparta, D.R., Stamatakis, A.M., van Leeuwen, W.A., Hardjoprajitno, J.E., Cho, S., Tye, K.M., Kempadoo, K.A., Zhang, F., Deisseroth, K. & Bonci, A. (2011). Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking. *Nature*, 475 (7356): 377-380.
145. Svíženská, I., Dubový, P., Šulcová, A. (2008). Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous systems structures – a short review. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 90 (4): 501-511.
146. Swanson, L.W. & Cowan, W.M. (1975). A note on the connections and development of the nucleus accumbens. *Brain Research*, 92: 324-330.
147. Swanson, L.W., Köhler, C. & Björklund, A. (1987). The limbic region I: the septohippocampal system, en Björklund, A., Hökfelt, T. & Swanson, L.W. (Eds.). *Handbook of chemical neuroanatomy, Vol. 5. Integrated systems of the CNS, Part I: hypothalamus, hippocampus, amygdala, retina* (pp. 125-278). Amsterdam: Elsevier.
148. Urcelay, G.P. & Miller, R.R. (2010). Two roles of the context in Pavlovian fear conditioning. *Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes*, 36 (2): 268-280.
149. Van der Stelt, M., Hansen, H.H., Veldhuis, W.B., Bär, P.R., Nicolay, K., Veldink, G.A., Vliegenhart, J.E.G. & Hansen, H. (2003). Biosynthesis of endocannabinoids and their modes of action in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicity Research*, 5(3): 183-200.
150. Voorn P., Vanderschuren, L.J.M.J., Groenewegen, H.J., Robbins, T.W. & Pennartz, C.M.A. (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in Neuroscience*, 27(8): 468-474.
151. Wang, W., Sun, D., Pan, B., Roberts, C.J., Sun, X., Hillard, C.J. & Liu, Q.S. (2010). Deficiency in endocannabinoid signaling in the nucleus accumbens induced by chronic unpredictable stress. *Neuropsychopharmacology*, 35 (11): 2249-2261.
152. Watson, J.B. & Rayner, R. (1920). Conditioned emotional reactions. *Journal of Experimental Psychology*, 3 (1): 1-14.
153. Weiskrantz, L. (1956). Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 49 (3): 381-391.

- 
- 
154. Winters, B.D., Krüger, J.M., Huang, X., Gallaher, Z.M., Ishikawa, M., Czaja, K., Krueger, J.M., Huang, Y.H., Schlüter, O.M. & Dong, Y. (2012). Cannabinoid receptor 1-expressing neurons in the nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (40): E2717-2725.
155. Witter, M.P. (1989). Connectivity of the rat hippocampus, en Chan-Palay, V., Köhler, C. (Eds.). The hippocampus: new vistas. *Neurology and Neurobiology*, Vol. 52. (pp. 53-69). New York: Alan R. Liss.
156. Yeomans, J.S. & Frankland, P.W. (1995). The acoustic startle reflex: neurons and connections. *Brain Research Reviews*, 21 (3): 301-314.
157. Yim, C.Y. & Mogenson, G.J. (1982). Response of nucleus accumbens neurons to amygdala stimulation and its modification by dopamine. *Brain Research*, 239 (2): 401-415.