



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN AMIGDALINA DE EGR-1 EN EL MIEDO  
CONDICIONADO VS EL MIEDO NO CONDICIONADO EN LA RATA  
UTILIZANDO EL MODELO DE EXPOSICIÓN A DEPREDADOR**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**REBECA MÉNDEZ HERNÁNDEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Elia Brosla Naranjo Rodríguez

**VOCAL:** Elena Zambrano González

**SECRETARIO:** Miguel Pérez de la Mora

**1er. SUPLENTE:** Oscar Armando Pérez Méndez

**2° SUPLENTE:** Mario Adán Moreno Eutimio

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO AL-204, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, DIVISIÓN  
NEUROCIENCIAS.**

**ASESOR DEL TEMA:** Dr. Miguel Pérez de la Mora

**SUSTENTANTE (S):**

**Rebeca Méndez Hernández**

## Contenido

|   |    |
|---|----|
| Resumen .....   | 5  |
| Capítulo 1. Miedo y ansiedad .....  | 6  |
| 1.1 ¿Qué es el miedo y la ansiedad? .....   | 6  |
| 1.2 Miedo condicionado y no condicionado .....  | 6  |
| 1.3 Trastornos de ansiedad .....  | 7  |
| Capítulo 2. Modelos animales de miedo y ansiedad. ....  | 8  |
| 2.1 Modelos no condicionados.....   | 8  |
| 2.1.1 Modelo de exposición a depredador o a su olor: .....  | 10 |
| 2.2 Modelos condicionados:.....   | 10 |
| 2.2.1 Modelo de exposición a depredador condicionado.....   | 12 |
| 2.2.2 Memoria en modelos de miedo y ansiedad. ....  | 12 |
| Capítulo 3. La amígdala .....   | 13 |
| 3.1 Generalidades sobre la amígdala .....   | 13 |
| 3.2 Núcleos amigdalinos.....  | 13 |
| 3.2.1 Complejo Basolateral (BLA).....   | 14 |
| 3.2.2 Núcleo Central (CeA).....   | 15 |
| 3.2.3 Núcleo Medial (MeA) .....   | 15 |
| 3.2.4 Islas intercaladas paracapsulares (ITC).....  | 16 |
| Capítulo 4. Participación de la amígdala en el miedo.....   | 16 |
| 4.1 Participación de la amígdala en el congelamiento condicionado .....   | 16 |
| 4.2 Participación de la amígdala en el miedo no condicionado.....   | 18 |
| 4.3 Participación de la amígdala en modelos de exposición a depredador o su<br>olor: estudios sobre lesiones..... | 19 |

|   |    |
|---|----|
| Capítulo 5. Plasticidad neuronal asociada al miedo condicionado .....                             | 20 |
| 5.1 Plasticidad neuronal.....   | 20 |
| 5.2 Mecanismos moleculares de la plasticidad asociada al miedo: genes de expresión temprana. .... | 20 |
| Capítulo 6. EGR-1 y su papel en el miedo y la memoria del miedo .....                             | 22 |
| 6.1 EGR-1 .....   | 22 |
| 6.2 EGR-1 como marcador de activación neuronal en el miedo. ....                                  | 22 |
| 6.3 EGR-1 necesario para el condicionamiento del miedo .....                                      | 23 |
| 6.4 EGR-1 en modelos de exposición a depredador.....  | 23 |
| Capítulo 7. Hipótesis y objetivos .....   | 24 |
| 7.1 Hipótesis:.....   | 24 |
| 7.2 Objetivos .....   | 24 |
| Capítulo 8. Metodología .....   | 25 |
| 8.1 Sujetos experimentales.....   | 25 |
| 8.1.1 Ratas. ....   | 25 |
| 8.1.2 Gato (depredador). ....   | 25 |
| 8.2 Grupos experimentales. ....   | 25 |
| 8.3 Dispositivo utilizado.....  | 26 |
| 8.4 Preparación para el experimento .....   | 27 |
| 8.5 Exposición a depredador.....  | 27 |
| 8.6 Prueba de retención.....  | 28 |
| 8.7 Análisis conductual .....   | 28 |
| 8.8 Perfusión y preparación de cerebros. ....   | 31 |
| 8.9 Inmunohistoquímica .....  | 32 |
| 8.10 Estereología.....  | 33 |
| 8.11 Análisis estadístico.....  | 35 |

|  |    |
|--|----|
| 8.11.1 Conducta.....   | 35 |
| 8.11.2 Conteo celular.....   | 35 |
| Capítulo 9. Resultados.....  | 36 |
| 9.1 Conducta.....  | 36 |
| 9.2 Expresión de EGR-1.....  | 41 |
| Capítulo 10. Discusión y conclusiones.....   | 47 |
| 10.1 Discusión.....  | 47 |
| 10.1.1 Consideraciones conductuales.....   | 47 |
| 10.1.2 Expresión de EGR-1 en el miedo condicionado y no condicionado en este trabajo vs otros estudios reportados.....             | 48 |
| 10.1.3 Expresión de EGR-1 en el miedo condicionado y no condicionado en el modelo de exposición a depredador vs otros modelos..... | 50 |
| 10.1.4 Flujo de información sugerido para el modelo de exposición a depredador.....  | 52 |
| 10.2 Conclusiones.....   | 56 |
| Bibliografía.....  | 57 |

### Índice de Tablas

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Modelos de miedo/ansiedad no condicionados..... | 8  |
| Tabla 2. Modelos de miedo condicionados.....             | 10 |
| Tabla 3. Medidas espacio temporales.....                 | 28 |
| Tabla 4. Medidas de evaluación del riesgo.....           | 29 |

## Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Fases de la memoria del miedo: adquisición, consolidación y evocación .....   | 12 |
| Figura 2. Tinción de Nissl de la amígdala derecha la rata.....  | 13 |
| Figura 3. Esquema general del procesamiento de información relacionada con el miedo condicionado .....                                  | 16 |
| Figura 4. Algunos blancos anatómicos de la amígdala y su posible función en relación al miedo y ansiedad.....                           | 17 |
| Figura 5. Mecanismos moleculares de plasticidad sináptica asociada a la memoria del miedo que incluyen a EGR-1 .....                    | 20 |
| Figura 6. Aparato Utilizado.....  | 26 |
| Figura 7. Tiempo de permanencia en el compartimento proximal .....  | 36 |
| Figura 8. Tiempo de permanencia en el compartimento distal .....  | 36 |
| Figura 9. Tiempo de permanencia en el túnel .....   | 37 |
| Figura 10. Número de transiciones .....   | 37 |
| Figura 11. Tiempo de latencia .....   | 38 |
| Figura 12. Número de episodios de conductas de evaluación del riesgo.....   | 39 |
| Figura 13. Número de acalamientos en el compartimento proximal .....  | 39 |
| Figura 14. Expresión de EGR-1 en el núcleo lateral de la amígdala .....   | 41 |
| Figura 15. Expresión de EGR-1 en el núcleo basal de la amígdala .....   | 42 |
| Figura 16. Expresión de EGR-1 en el núcleo central de la amígdala .....   | 43 |
| Figura 17. Expresión de EGR-1 en el núcleo medial de la amígdala .....  | 44 |
| Figura 18. Expresión de EGR-1 en la isla intercalada principal de la amígdala .....   | 45 |
| Figura 19. Flujo de información sugerido para el procesamiento de la información de miedo en el modelo de exposición a depredador ..... | 53 |

## Resumen

La amígdala es una estructura cerebral que está relacionada con el procesamiento de las emociones. Entre otras funciones, tiene una participación importante en la modulación del miedo y la ansiedad. Se han estudiado principalmente dos tipos de miedo/ansiedad en las ratas: uno es el miedo no condicionado, que se presenta inmediatamente después de la exposición de un individuo a un estímulo aversivo o potencialmente peligroso; y el otro es el miedo condicionado, que se presenta después de un periodo de condicionamiento clásico (Pavloviano).

En este trabajo se analizaron las diferencias que existen en la expresión amigdalina de EGR-1 (un indicador de plasticidad neuronal asociada al condicionamiento del miedo) entre los dos tipos de miedo utilizando el modelo de exposición a depredador. La respuesta de miedo no condicionada se indujo al exponer a las ratas a un gato, mientras que la respuesta de miedo condicionada se indujo al reexponerlas al contexto previamente asociado a su depredador. Posteriormente, se midió la expresión de EGR-1, haciendo uso de una técnica inmunohistoquímica junto con una técnica estereológica. La expresión de EGR-1 se cuantificó en los núcleos lateral (LA), basal (BA), central (CeA), medial (MeA) y la isla intercalada principal (IM) de la amígdala y se comparó entre los grupos. De igual manera, se midió de la conducta del animal para corroborar que el modelo efectivamente provocó una respuesta de miedo no condicionado y condicionado.

Se observó un aumento en la evitación y las conductas de evaluación del riesgo tanto para el modelo condicionado como el no condicionado con respecto al control, lo que corrobora que el modelo utilizado fue el apropiado para provocar ambas respuestas de miedo. La expresión de EGR-1 se vio aumentada significativamente en el núcleo lateral (LA), el núcleo basal (BA) y la isla intercalada principal (IM) de la amígdala de las ratas en el modelo condicionado con respecto al control, no así en el modelo no condicionado. Estos resultados sugieren que los circuitos involucrados en el procesamiento del miedo innato a un depredador son diferentes a aquellos que participan en procesar la información relacionada a un contexto asociado a un depredador (miedo condicionado).

## Capítulo 1. Miedo y ansiedad

### 1.1 ¿Qué es el miedo y la ansiedad?

La ansiedad es una respuesta que detecta y protege a un individuo ante un peligro real o potencial (Palomares-Castillo et al. 2012). El miedo es una respuesta que se encuentra relacionada con la ansiedad; la diferencia principal entre ellos es que la ansiedad se presenta ante la anticipación de un estímulo desconocido o poco definido mientras que el miedo se presenta ante un estímulo bien definido (Pérez de la Mora et al. 2007). Ambas respuestas son adaptativas y se presentan conservadas a través de las especies, incluyendo a los mamíferos superiores.

El miedo y la ansiedad, independientemente del estímulo que los suscite, pueden estudiarse en función de tres componentes principales: la respuesta fisiológica, la respuesta conductual y la respuesta emocional o cognitiva. La respuesta fisiológica se presenta como el aumento de la frecuencia cardíaca, hiperventilación, sudoración, aumento sérico de algunas hormonas, etc. La respuesta conductual se presenta como la evitación o confrontación al estímulo ansiogénico a través de diferentes conductas defensivas. Por otro lado, la respuesta cognitiva o emocional puede identificarse por los síntomas que presente el individuo. Para los fines de este trabajo, se hace principal referencia al componente conductual del miedo.

### 1.2 Miedo condicionado y no condicionado

A pesar de la enorme variabilidad de estímulos que inducen miedo, se han distinguido principalmente dos tipos de miedo: el miedo no condicionado y el miedo condicionado.

El miedo no condicionado es el miedo que se presenta de manera innata, es decir, el animal no necesita haber sido expuesto al estímulo previamente para presentar la conducta de miedo sino que se presenta naturalmente. Este tipo de miedo es propio de cada especie y es estímulo-específico.

Por el contrario, el miedo condicionado se presenta después de un periodo de aprendizaje. Para esto, el animal es expuesto a un estímulo que causa miedo innato (estímulo incondicionado), al mismo tiempo que se le presenta un estímulo neutro (estímulo condicionado). Al presentar los dos estímulos pareados una o varias veces, el animal crea una asociación entre ellos, de manera que la posterior presentación del estímulo condicionado evoca al estímulo incondicionado, por lo que el animal presenta las mismas respuestas de miedo (Ehrlich et al. 2009).

### 1.3 Trastornos de ansiedad

En ocasiones, las respuestas de miedo y ansiedad pueden prolongarse demasiado, suscitarse ante estímulos poco o nada aversivos, o ser exageradas. En estos casos ya no hablamos de una respuesta fisiológicamente favorable sino de un trastorno. Según el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (American Psychiatric Association 2002), existen 13 trastornos de ansiedad, entre los que se encuentran:

- Trastorno de ansiedad generalizada
- Crisis de angustia
- Fobia social
- Agorafobia
- Fobia específica
- Trastorno por estrés agudo
- Trastorno por estrés postraumático

En México, los trastornos de ansiedad son altamente prevalentes, de hecho son los trastornos psiquiátricos más comunes. Aproximadamente el 14.3% de la población mexicana adulta ha padecido un trastorno de ansiedad en algún momento de su vida (Medina-Mora et al. 2007).

Para tratar los trastornos de ansiedad se han desarrollado distintos tipos de terapias, tanto psicológicas como farmacológicas. Las terapias farmacológicas incluyen la administración de varios fármacos como inhibidores de la recaptura de serotonina, benzodiazepinas, inhibidores de la monoaminoxidasa y antidepresivos tricíclicos (Farach et al. 2012).

A pesar de existir una gran cantidad de fármacos para tratar estos trastornos, los tratamientos actuales no son ideales debido a la gran variedad de efectos adversos que presentan. Además, entre un tercio y la mitad de los pacientes con el tratamiento de primera línea no logran una remisión sostenida de la ansiedad (Farach et al. 2012) , por lo que es necesario implementar nuevas estrategias terapéuticas para abordar estos trastornos.

## Capítulo 2. Modelos animales de miedo y ansiedad.

Dado que por razones éticas y prácticas resulta problemático trabajar con humanos, se han desarrollado distintos modelos animales para entender cómo es que el sistema nervioso procesa la información relacionada con el miedo y la ansiedad; éstos serán brevemente expuestos a continuación.

### 2.1 Modelos no condicionados.

Estos modelos hacen uso de las conductas innatas que presentan los animales ante un estímulo ansiogénico. Entre estos modelos se encuentran el enterramiento defensivo, el laberinto elevado en forma de “+” y el modelo de exposición a depredador. Los primeros dos se describen brevemente en la Tabla 1.

| Modelo                                  | Esquema   | Estímulo ansiogénico | Principales conductas a medir   | Significado atribuido  |
|---|---|----------------------|---|--|
| Enterramiento defensivo                 |    | Electrodo            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tiempo de latencia: tiempo que el roedor tarda en empezar a enterrar el electrodo después del primer choque</li> <li>- Tiempo de enterramiento: tiempo total que el animal enterra al electrodo</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Entre mayor sea la latencia, menor reactividad/ ansiedad tiene el animal.</li> <li>- Entre mayor sea el tiempo de enterramiento, mayor ansiedad tiene el animal.</li> </ul> |
| Laberinto elevado en forma de signo "+" |  | Espacios abiertos    | Porcentaje de tiempo que la rata permanece en los brazos abiertos con respecto a los brazos cerrados  | Entre mayor sea el porcentaje en los brazos abiertos, menor ansiedad tiene el animal.  |

Tabla 1. Modelos de miedo/ansiedad no condicionados. Elaborado por Rebeca Méndez Hernández.

### 2.1.1 Modelo de exposición a depredador o a su olor:

Este modelo hace uso de las conductas innatas que los roedores presentan hacia un depredador natural. Este tipo de estímulo es etológicamente muy relevante, ya que la supervivencia del animal depende de la respuesta que tenga éste. La gran diversidad de conductas presentadas por el animal, primeramente descritas por Blanchard y Blanchard (R J Blanchard & Blanchard 1989) , ha dado origen a una gran variedad de modelos, que utilizan tanto diferentes tipos de estímulos como diferentes aparatos. Como estímulos, se han utilizado gatos vivos (Adamec et al. 2012; Martinez et al. 2011; Rosen et al. 2005) , telas impregnadas con olor de gato (Blanchard et al. 2001; Li et al. 2004; Takahashi et al. 2007; Zangrossi & File 1992), collares impregnados con olor a gato (R. A. Dielenberg et al. 2001; R. a Dielenberg et al. 2001), telas impregnadas con un compuesto aislado de la orina de zorro denominado trimetiltetrazona (TMT) (Morrow et al. 2000; Wallace & Rosen 2001), entre otros. Como aparatos, se han utilizado arenas muy grandes (Adamec et al. 2012; Rosen et al. 2005), cajas con compartimentos y sitios de escondite (Martinez et al. 2011; R. A. Dielenberg et al. 2001; R. a Dielenberg et al. 2001), cajas muy largas y estrechas que funcionan como un túnel (Blanchard et al. 2001; Li et al. 2004; Takahashi et al. 2007), entre otras.

Cualquiera que sea la variación del modelo, se han descrito conductas que prevalecen en la mayoría de ellos. Éstas incluyen la evitación al estímulo y la evaluación del riesgo (*risk assesment*) en sus varias presentaciones; dichas conductas se describirán con detalle en la metodología (Sección 8.7).

### 2.2 Modelos condicionados:

En este modelo, se utiliza un esquema de condicionamiento clásico para suscitar miedo en el sujeto experimental a la presentación de un estímulo determinado. En la tabla 2 se describen brevemente algunos ejemplos de modelos condicionados.

| Modelo  | Estímulo incondicionado                  | Estímulo condicionado                                  | Principales conductas a medir | Respuesta esperada   |
|---|--|--|-------------------------------|--|
| Congelamiento condicionado a una señal discreta | Choque eléctrico en las patas del animal | Luz o tono de cierta frecuencia (señal discreta)       | Tiempo total de congelamiento | Después del condicionamiento, tiempo de congelamiento será mayor (que antes del condicionamiento) al exponer a los animales a la luz o tono.                                     |
| Congelamiento condicionado al contexto          | Choque eléctrico en las patas del animal | Dispositivo donde se lleva a cabo la prueba (contexto) | Tiempo total de congelamiento | Después del condicionamiento, tiempo de congelamiento será mayor (que antes del condicionamiento) al exponer a los animales al dispositivo donde se realizó el condicionamiento. |

Tabla 2. Modelos de miedo condicionado en roedores. Elaborado por Rebeca Méndez Hernández.

### 2.2.1 Modelo de exposición a depredador condicionado.

Este modelo utiliza como estímulo incondicionado a un depredador o su olor y como estímulo condicionado, la caja donde se lleva a cabo el experimento, por lo que se trata de un modelo de condicionamiento al contexto. Se ha observado que, a diferencia de otros modelos condicionados, una sola exposición de un roedor a su depredador natural es suficiente para condicionar al animal, de modo que al reexponerlo al contexto donde fue condicionado, el animal muestra conductas de evitación y evaluación del riesgo (R. A. Dielenberg et al. 2001; Blanchard, Blanchard, et al. 2005).

### 2.2.2 Memoria en modelos de miedo y ansiedad.

Es importante recalcar que al evaluar las respuestas de miedo condicionado, se está midiendo indirectamente la capacidad del individuo de retener la información que se asoció durante el condicionamiento, por lo tanto los modelos no condicionados, además de evaluar miedo, evalúan memoria. La memoria es el proceso por el cual un individuo puede retener y recuperar información (Bailey et al. 1996) y se considera que está compuesta principalmente por tres fases: la adquisición, la consolidación y la evocación (Figura 1). En el miedo condicionado, la adquisición ocurre cuando el animal está asociando el estímulo incondicionado con el estímulo condicionado. La consolidación es el proceso que ocurre cuando la memoria pasa de un estado lábil a un estado permanente, este proceso puede durar de minutos a días. Por su parte, la evocación se presenta cuando el animal es reexpuesto al estímulo condicionado, poniendo en evidencia la asociación entre ambos estímulos (Abel & Lattal 2001). Adicionalmente, la memoria puede ser modificada posteriormente a través de la extinción, en la que ésta se pierde, o la reconsolidación, durante la cual dicha memoria puede perderse o reforzarse.

Dado lo anterior, es posible considerar que en un modelo de miedo condicionado, la fase de adquisición del condicionamiento vista por separado representa una respuesta de *miedo no condicionado* al depredador, y que ésta genera al mismo tiempo (o muy poco después) una memoria de *miedo condicionado* al contexto en

donde la exposición al depredador fue realizada, que se pondría de manifiesto durante la evocación. Por lo tanto, la simple exposición de una rata a un estímulo aversivo (por ejemplo, un depredador) podría considerarse también un modelo de adquisición de la memoria; y la posterior exposición de una rata a un contexto asociado a este estímulo podría considerarse también un modelo de evocación de la memoria de miedo.



Figura 1. Fases de la memoria al miedo: adquisición, consolidación y evocación.

Tomado de (Abel & Lattal 2001).

## Capítulo 3. La amígdala

### 3.1 Generalidades sobre la amígdala

Se han encontrado diversas estructuras cerebrales que juegan un papel importante en el procesamiento del miedo y la ansiedad; entre ellas, la amígdala tiene una destacada importancia. La amígdala se encuentra en la profundidad del lóbulo temporal, aproximadamente desde -1.20 a -3.60 mm con respecto al bregma, en el caso de la rata. Ésta forma parte del sistema límbico, un circuito al que se le ha atribuido la modulación de las emociones.

### 3.2 Núcleos amigdalinos

La amígdala es un complejo formado por aproximadamente 13 núcleos (Sah et al. 2003), que son bastante variables tanto por su naturaleza como por sus funciones. Entre ellos se encuentran el complejo basolateral, el núcleo central, el núcleo medial y las islas intercaladas paracapsulares; estos núcleos son importantes en relación con su participación en el procesamiento del miedo. Además, existen otros núcleos que algunos autores consideran parte de la amígdala, como el

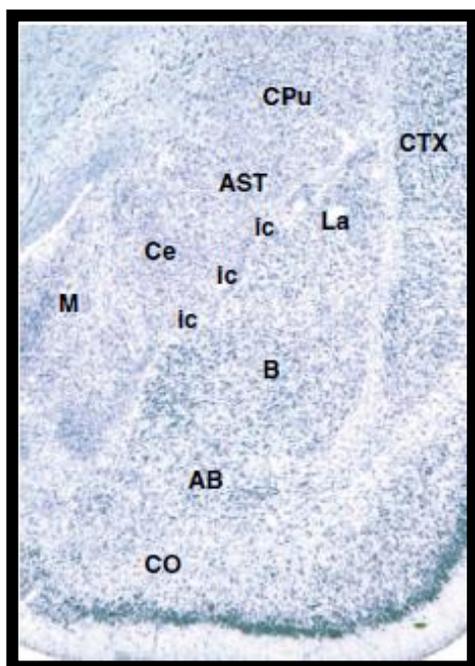


Figura 2.  
Tinción de Nissl de la amígdala derecha la ratona. Abreviaturas de áreas amigdalinas: La, núcleo lateral; ic, islas intercaladas paracapsulares; B, núcleo basal; Ce, núcleo central; M, núcleo medial; AB, núcleo basal accesorio; CO, núcleo cortical. Abreviaturas de áreas no amigdalinas: CTX, corteza; CPu, caudado putamen; AST, área amígdalo-estriatal.

Tomado de Le Doux et al. 2007.

núcleo cortical, el área amígdalo-estriatal, entre otros; sin embargo, éstos parecen tener una participación relativamente menos importante en la modulación del miedo.

### 3.2.1 Complejo Basolateral (BLA)

Este complejo amigdalino fue el primero en ser identificado por su tamaño y forma (Burdach). Dicho complejo se encuentra, como su nombre lo indica, en la parte basal y lateral de la amígdala, bardeado por la cápsula externa. Se compone de tres principales núcleos: el núcleo lateral (LA), el núcleo basal (BA/ B) y el núcleo basal accesorio o núcleo basomedial (AB/ BMA). El BLA contiene principalmente dos tipos de neuronas, las glutamatérgicas y las gabaérgicas (Pape & Pare 2010). Las glutamatérgicas son la mayoría, constituyendo aproximadamente el 80% de las neuronas del BLA. Estas neuronas son multipolares y tienen grandes árboles dendríticos que inervan diferentes sitios cerebrales. Las neuronas gabaérgicas, que constituyen aproximadamente el 20% de las neuronas del BLA, son más heterogéneas y

forman parte de los circuitos locales; además, tienen receptores para distintos tipos de neuropéptidos, por lo que pueden clasificarse en distintas familias neuronales dependiendo del neuropéptido expresado.

El complejo basolateral tiene una función importante como receptor (*input*) de la información sensorial relacionada con el miedo, principalmente a través del núcleo lateral.

### 3.2.2 Núcleo Central (CeA)

El núcleo central de la amígdala se ubica de manera medial al núcleo basolateral, y dorsal al núcleo basomedial. Aunque dicho núcleo se compone de varios subnúcleos, en forma práctica se le divide en una porción centro medial (CeM) y centro lateral (CeL). El CeA se caracteriza por tener una gran cantidad de neuronas GABAérgicas, las cuales parecen estar involucradas en la formación de circuitos locales (Swanson & Petrovich 1998). De manera importante, existen proyecciones corticales hacia estos núcleos, dada por medio de neuronas piramidales glutamatérgicas, utilizando algunas interneuronas de transmisión GABAérgica. Estas proyecciones tienen un papel importante en la modulación del miedo dado por estas estructuras.

El núcleo central es el núcleo amigdalino que tiene más proyecciones hacia otras partes del cerebro y se ha demostrado que funciona como la principal estación de la salida (*output*) de información relacionada con el miedo (Davis 1992).

### 3.2.3 Núcleo Medial (MeA)

El núcleo medial de la amígdala se encuentra, como su nombre lo indica, en la parte más medial de la amígdala, cercano al tracto óptico. Las células de este núcleo comparten características con las del núcleo central (Swanson & Petrovich 1998) .

Este núcleo puede dividirse en la parte posterior y la parte anterior. El núcleo medial anterior recibe proyecciones directas del bulbo olfatorio accesorio, que procesa información vomeronasal. Por su parte, el núcleo medial posterior recibe

proyecciones del bulbo olfatorio principal, que procesa información olorosa (Takahashi 2014). Además se ha demostrado la participación del núcleo medial en muchas conductas agresivas, defensivas y sexuales (Takahashi et al. 2005).

### 3.2.4 Islas intercaladas paracapsulares (ITC)

Las islas intercaladas paracapsulares son pequeños conglomerados de células distribuidas a través de la amígdala. Existen principalmente dos grupos de islas intercaladas: un grupo de islas que se encuentra en la parte lateral de la amígdala, cercano a la cápsula externa, denominadas islas laterales; y otro grupo que se encuentra entre el núcleo central y el complejo basolateral, denominadas islas mediales. Además existe una isla de mayor tamaño, denominada isla principal (IM), que se encuentra de manera ventral al CeA y BLA. Estas islas son importantes mediadoras de la comunicación intraamigdalina, ya que algunas de las fibras provenientes del BLA hacia el CeA o MeA tienen un relevo en las islas mediales. Adicionalmente, las islas se encuentran en comunicación con la corteza prefrontal, que parece estar participando en la modulación de la ansiedad (Palomares-Castillo et al. 2012).

## Capítulo 4. Participación de la amígdala en el miedo

### 4.1 Participación de la amígdala en el congelamiento condicionado

La mayoría de los estudios sobre la función de la amígdala se han centrado en estudiar su papel en el miedo condicionado, sobre todo utilizando el modelo de congelamiento condicionado, en el cual se ha demostrado que la amígdala tiene un papel fundamental.

A partir de ello, se sabe que cuando hay un estímulo aversivo en el ambiente, la información sobre este estímulo es recibida por el individuo a través de los órganos de los sentidos y es procesada por el tálamo y la corteza, desde donde proyecta hacia la amígdala, principalmente a través del núcleo lateral. Se cree que

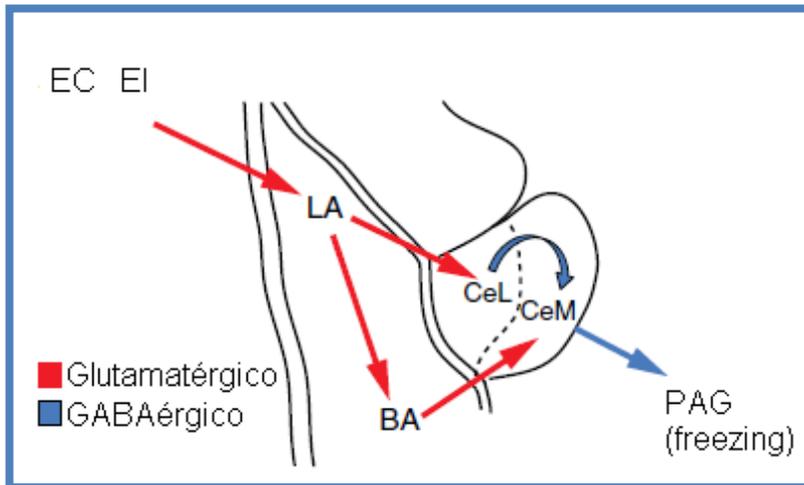


Figura 3. Esquema general del procesamiento de información relacionada con el miedo condicionado.

Modificado de Paré, 2012.

el núcleo lateral es el sitio donde se crea la asociación del estímulo no condicionado con el estímulo condicionado (LeDoux 2000). También se ha propuesto que el núcleo lateral tiene un papel importante en la evaluación de la valencia de los estímulos (Davis 1992).

Una vez en el núcleo lateral, la información se transmite hacia el núcleo central de la amígdala ya sea a través de los núcleos basales (BA y BMA) o de las islas intercaladas paracapsulares. Desde el núcleo central, esta información viaja hacia distintos núcleos encargados de mediar la conducta de miedo tales como la sustancia gris periacueductal (PAG) que se encarga de implementar la respuesta del congelamiento (*freezing*), y el núcleo cama de la estría terminal (BNSt) que recibe proyecciones del BLA y CeA (Walker et al. 2003) y se considera por algunos autores como parte de una estructura más grande a la que se ha llamado la amígdala extendida (de Olmos & Heimer 1999) . Otras proyecciones de la amígdala llegan al hipotálamo y al tallo cerebral, en donde se medían las respuestas hormonales y autonómicas respectivamente. En la figura 4 se muestran algunas de las proyecciones de la amígdala y su posible función en relación al miedo y la ansiedad.

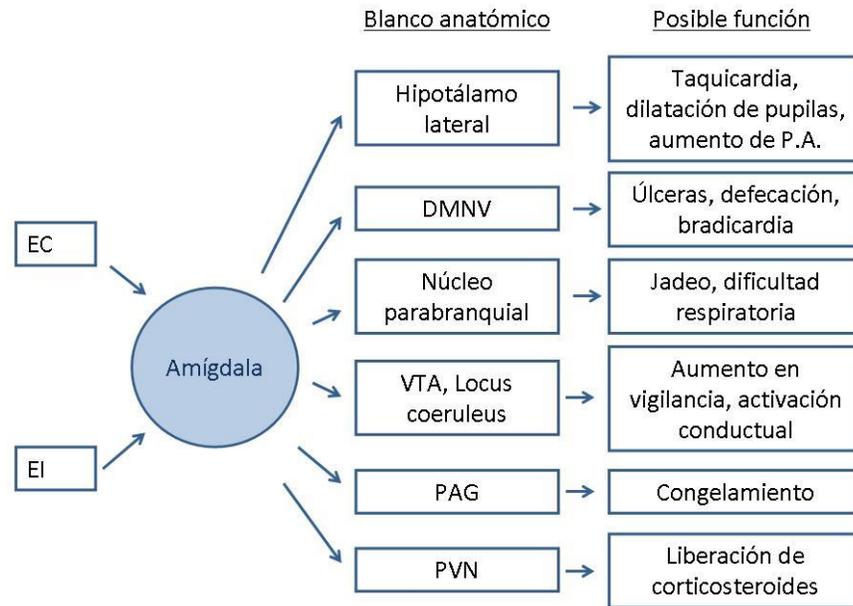


Figura 4. Algunos blancos anatómicos de la amígdala su posible función en relación al miedo y la ansiedad. Abreviaturas: EC, estímulo condicionado; EI, estímulo incondicionado; DMNV, núcleo dorsal motor del vago; VTA, núcleo ventral tegmental; PAG, sustancia gris periacueductal; PVN, núcleo paraventricular del hipotálamo. Modificado por Rebeca Méndez Hernández con base en (Davis & Whalen, 2001; Davis, 1992)

Tanto el núcleo central como las islas intercaladas se encuentran en comunicación constante con la corteza prefrontal, que modula el flujo de información a través de este circuito (Sotres-Bayon & Quirk 2010). Además existen varios circuitos inhibitorios que median la salida de información por el CeM; por ejemplo, desde las neuronas gabaérgicas de la IM y las islas mediales o desde las neuronas inhibitorias del CeL.

#### 4.2 Participación de la amígdala en el miedo no condicionado.

Parece ser que el miedo no condicionado es procesado por la amígdala de una manera diferente al miedo condicionado y en realidad no ha sido posible esclarecer con precisión el rol de los núcleos amigdalinos en este tipo de miedo,

ya que parece ser dependiente del modelo que se esté utilizando (Rosen 2004). Incluso se plantea que la amígdala no es necesaria para implementar las respuestas de miedo no condicionado, ya que lesiones en la amígdala o en el núcleo basolateral no impiden la expresión de este tipo de miedo en el laberinto elevado (Ribeiro et al. 2011) . Lo que sí es claro es que la amígdala tiene un papel modulador en la ansiedad no condicionada mediado a través de la actividad de algunos neurotransmisores como la dopamina (Pérez de la Mora et al. 2010), la oxitocina y la vasopresina (Viviani & Stoop 2008).

#### 4.3 Participación de la amígdala en modelos de exposición a depredador o su olor: estudios sobre lesiones.

Uno de los modelos no condicionados que, por su relevancia etológica, se ha utilizado más para estudiar el papel de la amígdala en este tipo de miedo es el modelo de exposición a depredador. Para ello se han realizado diversos estudios en los que se lesionan diferentes núcleos de la amígdala y se observa el efecto de esta lesión en el comportamiento de los roedores al ser expuestos a su depredador natural, el gato.

Así, se ha encontrado que lesiones en el MeA disminuyen las conductas defensivas en este modelo tanto en su variedad no condicionada (Li et al. 2004; Müller & Fendt 2006; Martinez et al. 2011) como condicionada (Blanchard, Canteras, et al. 2005; Martinez et al. 2011). Por otra parte, al lesionar los núcleos del complejo basolateral se ha observado un bloqueo en la consolidación de la memoria del miedo a depredador (Takahashi et al. 2007), ya que disminuyen las conductas defensivas en modelos condicionados pero no en los no condicionados (Wallace & Rosen 2001; Martinez et al. 2011). En cuanto al núcleo central, las lesiones en este sitio no parecen tener una gran influencia en el miedo dado por la exposición al olor/ presencia de un depredador, ya que su lesión no provoca un cambio en las respuestas del animal hacia el depredador (Li et al. 2004; Martinez et al. 2011).

## Capítulo 5. Plasticidad neuronal asociada al miedo condicionado

### 5.1 Plasticidad neuronal.

El proceso mediante el cual un sistema neural es capaz de cambiar sus funciones y estructuras en respuesta a un estímulo se denomina plasticidad neuronal (Miyamoto 2006). El estímulo puede ser tanto algo interno, por ejemplo, daño tisular, como externo, por ejemplo una nueva experiencia. Por lo tanto, exponer a un individuo a una prueba de ansiedad, como en el caso de los modelos previamente descritos, induce la adquisición, consolidación y evocación de memorias que surgen a consecuencia de la plasticidad neuronal generada.

Se ha descrito que la plasticidad neuronal asociada a la memoria, a nivel molecular, está mediada por un aumento en la concentración de calcio intracelular dada por la activación de algunos receptores, principalmente los receptores NMDA. Esta activación da origen a varias cascadas de señalización que culminan con la activación de CREB, un factor de transcripción que a su vez induce la expresión de otras proteínas (Figura 5). Todos estos cambios, a la larga, provocan modificaciones en la estructura, función y conectividad de las neuronas involucradas (Alberini 2009).

### 5.2 Mecanismos moleculares de la plasticidad asociada al miedo: genes de expresión temprana.

Las vías de transducción de señales activadas por la adquisición de la memoria convergen en la activación de ciertos genes como *creb*, *c-fos*, y *egr-1*. Estos genes presentan un aumento en su activación al poco tiempo de que la neurona en cuestión ha recibido un estímulo; son denominados genes inmediatos tempranos (IEG) y su inducción es importante porque controlan la transcripción de muchos genes relacionados con la plasticidad neuronal. En particular CREB y EGR-1 son factores de transcripción que se han relacionado ampliamente con la plasticidad sináptica asociada a la memoria (Knapska & Kaczmarek 2004; Alberini 2009).

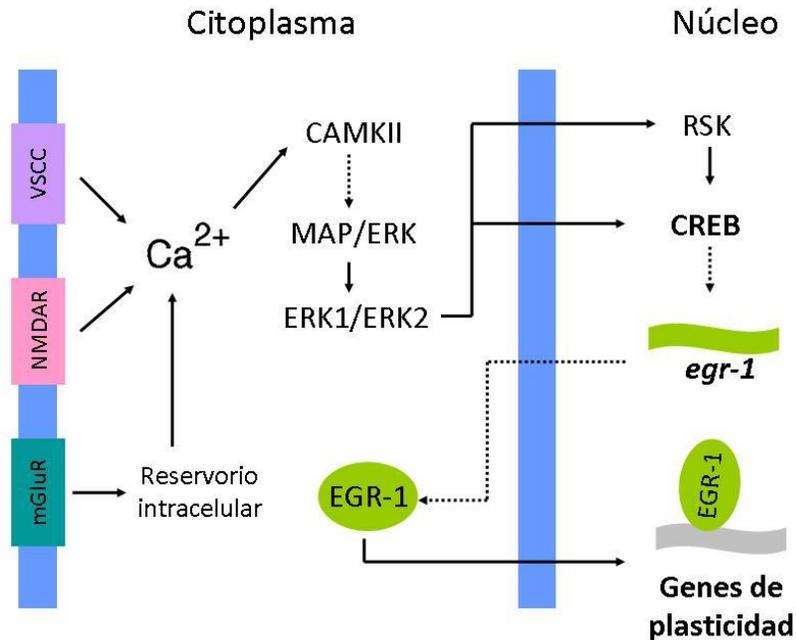


Figura 5. Mecanismos moleculares de plasticidad sináptica asociada a la memoria del miedo que incluyen a EGR-1. Cuando los receptores NMDA de la célula postsináptica son activados, se lleva a cabo un aumento intracelular de  $Ca^{2+}$ , esto activa la vía de transducción de señales MAPK/ERK, lo que lleva a la activación de la proteína CREB (fosforilación) que es un factor de transcripción. CREB induce la transcripción de EGR-1, que es transcrito, traducido y llevado nuevamente al núcleo donde funciona como factor de transcripción para varios genes relacionados con la plasticidad. Abreviaturas: VSCC, canales de calcio sensibles a voltaje; NMDAR, receptor N-metil D-aspartato; mGluR, receptor metabotrópico de glutamato. CAMKII, proteína cinasa tipo II dependiente de calcio/calmodulina; MAP, proteína cinasa mitógeno-activada; ERK, cinasa regulada extracelular; RSK, cinasa 6 ribosomal, CREB proteína de unión a elemento de respuesta a AMPc; EGR-1 proteína de respuesta temprana a crecimiento tipo 1. Elaborado por Rebeca Méndez Hernández con base en (Kaczmarek & Chaudhuri 1997; Orsini & Maren 2012; Pape & Pare 2010).

## Capítulo 6. EGR-1 y su papel en el miedo y la memoria del miedo

### 6.1 EGR-1

EGR-1, también denominado Zif268, NGFA-1 o Krox2, es un factor de transcripción con un dominio de dedos de zinc (una familia de proteínas que tienen motivos de unión a DNA). Se encuentra expresado en una gran diversidad de tejidos, y funciona como factor de transcripción de una gran cantidad de genes. Específicamente en el sistema nervioso central, se ha encontrado que funciona como factor de transcripción para genes como la sinapsina, glutamato deshidrogenasa, etc. (Knapska & Kaczmarek 2004).

### 6.2 EGR-1 como marcador de activación neuronal en el miedo.

Como se mencionó anteriormente, el marcador EGR-1 (ya sea la proteína o el mRNA) se ha utilizado para detectar la activación neuronal que se dispara inmediatamente después de alguna actividad, tarea o conducta. Ha sido muy útil para detectar qué neuronas se encuentran implicadas en esta tarea o conducta y así poder mapear las redes neuronales implicadas en ella.

En los modelos de miedo, se ha observado que la expresión EGR-1 aumenta en el núcleo lateral de la amígdala de la rata inmediatamente después del condicionamiento al contexto (adquisición) (Rosen et al. 1998; Malkani & Rosen 2000b). De igual manera, la expresión de EGR-1 aumenta en núcleo lateral después de una prueba de *freezing* condicionado al contexto (Hall et al. 2001; Antoine et al. 2013). Además del aumento en la expresión de EGR-1 en el núcleo lateral, en otros dos estudios (Maddox et al. 2011; Hall et al. 2001) se ha encontrado un aumento en la expresión de EGR-1 en el complejo basolateral y central en la adquisición del miedo condicionado.

### 6.3 EGR-1 necesario para el condicionamiento del miedo

Además de su uso como marcador de activación neuronal, se ha demostrado que EGR-1 tiene un papel fundamental en la consolidación de la memoria del miedo, ya que si se bloquea su expresión en el núcleo lateral de la amígdala mediante un oligonucleótido antisentido, no se lleva a cabo el condicionamiento en el modelo de freezing condicionado (Maddox et al. 2011). Además, si el condicionamiento se bloquea por un conocido ansiolítico, el diazepam, la expresión amigdalina de EGR-1 disminuye (Malkani & Rosen 2000a) . Esto sugiere que para el condicionamiento al miedo, la expresión de IEG en la amígdala no es inespecífica sino que EGR-1 tiene un papel clave en la plasticidad asociada a este tipo de miedo.

### 6.4 EGR-1 en modelos de exposición a depredador

Se ha evaluado la expresión de EGR-1 (ya sea la proteína o el mRNA) en modelos de exposición a depredador no condicionado. Un estudio de Rosen y colaboradores reporta que *egr-1* no se expresa en la amígdala después de la exposición a un depredador (Rosen et al. 2005). En contraste, otros estudios reportan un aumento en la expresión de este gen en el núcleo central de la amígdala al exponer a la rata al TMT (Asok et al. 2013). No se ha realizado, sin embargo, un estudio que evalúe la expresión de EGR-1 en un modelo de miedo condicionado a depredador ni se estudiado la expresión de dicho gen en las intercaladas paracapsulares que, como se señaló antes, funcionan a manera de interfase entre el BLA y el Ce.

Con todos estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue realizar un estudio donde se evalúe diferencialmente el papel de la amígdala en el miedo condicionado y no condicionado, utilizando el mismo modelo, de modo que las diferencias sean comparativas. De igual manera, se busca esclarecer el papel de la amígdala en la exposición a depredador. Se decidió utilizar al marcador EGR-1 por su demostrada participación en la plasticidad neuronal asociada al miedo.

## Capítulo 7. Hipótesis y objetivos

### 7.1 Hipótesis:

Existe un patrón diferencial de expresión de EGR-1 en los núcleos amigdalinos principalmente implicados en la modulación de la ansiedad/miedo (LA, BA, Ce, MEA e IM) entre la exposición aguda de una rata macho a su depredador (modelo no condicionado) y la exposición de la rata a un contexto asociado a esa experiencia (modelo condicionado).

### 7.2 Objetivos

General:

- Analizar las posibles diferencias que existen en la expresión de EGR-1, entre el modelo de exposición a depredador y el modelo condicionado de exposición al depredador en la rata.

Particulares:

- Comprobar que bajo nuestras condiciones el modelo utilizado es adecuado para provocar tanto miedo no condicionado como condicionado en el sujeto de estudio mediante la observación de la conducta presentada.
- Medir la expresión de EGR-1 mediante la cuantificación de células inmunopositivas para esta proteína en los núcleos lateral, basal, central, medial y la isla intercalada principal de la amígdala en ratas expuestas a un gato en forma aguda.
- Medir la expresión de EGR-1 mediante la cuantificación de células inmunopositivas para esta proteína en los núcleos lateral, basal, central, medial y la isla intercalada principal de la amígdala en ratas expuestas al contexto en el cual fueron previamente expuestas a su depredador.

- Comparar la expresión de EGR-1 en los núcleos amigdalinos estudiados tanto durante la fase de adquisición del miedo (miedo no condicionado) como tras su evocación (miedo condicionado).

## Capítulo 8. Metodología

### 8.1 Sujetos experimentales.

#### 8.1.1 Ratas.

Para todos los experimentos se utilizaron ratas macho adultas, de  $250 \pm 10$  g de peso criadas en el bioterio de Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

#### 8.1.2 Gato (depredador).

El depredador utilizado para este trabajo fue un gato macho adulto amablemente prestado por la Dra. Robyn Hudson del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

### 8.2 Grupos experimentales.

Se hizo uso de cuatro grupos experimentales para estudiar los objetivos planteados.

*Grupo no condicionado:* Las ratas de este grupo fueron expuestas al depredador dentro de una caja especial (descrita en el apartado 8.3). Este grupo corresponde al modelo de miedo innato o no condicionado.

*Grupo control no condicionado:* Las ratas de este grupo fueron introducidas a la misma caja que las anteriores pero sin ser expuestas a su depredador. Este grupo funciona como control del modelo de miedo innato o no condicionado.

*Grupo condicionado:* Las ratas de este grupo fueron expuestas al depredador y reexpuestas 24 horas después a la caja donde recibieron el estímulo aversivo (prueba de retención). Este grupo corresponde al modelo de miedo condicionado.

*Grupo control condicionado:* Las ratas fueron expuestas a la misma caja en donde las ratas del grupo anterior fueron expuestas al gato, pero en este caso sin él. 24 horas después las ratas fueron nuevamente introducidas a esta caja. Este grupo funciona como control del modelo de miedo condicionado.

### 8.3 Dispositivo utilizado.

El dispositivo consistió en una caja de acrílico (Figura 6) de las siguientes medidas: 130cm (largo) x 33cm (ancho) x 50cm (alto), con varios compartimentos conectados de manera que la rata pudiera trasladarse de un compartimento a otro. El primer compartimento, denominado compartimento distal, medía 33 cm de largo. Éste se encontraba conectado al compartimento proximal, de las mismas medidas, a través de un túnel de 10 cm de diámetro y 33 cm de largo. Adyacente al compartimento proximal, se encontraba el compartimento del gato, que es donde se colocó al depredador. La caja proximal y el compartimento del gato se encontraban comunicados por una pared de acrílico transparente y con orificios, de manera que ambos animales pudieran verse y olerse a través de ella.

En el piso de la caja se colocó aserrín de modo que el animal se sintiera más cómodo y fuera más sencillo realizar la limpieza entre cada prueba.

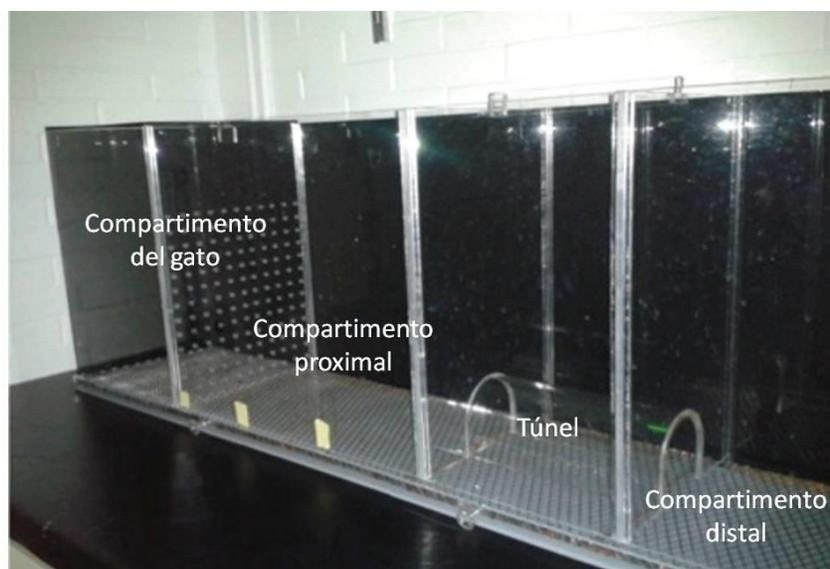


Figura 6. Aparato utilizado.

#### 8.4 Preparación para el experimento

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a la normatividad vigente para el cuidado de los animales de laboratorio, NOM-0062-ZOO-1999.

Las ratas fueron trasladadas del bioterio al laboratorio de conducta tres días antes del comienzo de la habituación. Ahí se mantuvieron a temperatura y humedad controlada ( $20\pm 5$  °C y  $45\pm 5\%$  de humedad), así como en un ciclo de 12 hrs de luz y 12 de oscuridad (7 am. -7 pm.) desde su traslado hasta el fin del experimento. Todos los experimentos se realizaron en la fase de luz, entre las 10 am y las 4 pm para así evitar variaciones debidas al ciclo circadiano del animal. Todas las pruebas se llevaron a cabo bajo una iluminación verde, ya que ésta es la frecuencia a la que las ratas tienen una mejor visión (Szel & Rohlich 1992).

##### *Habituación*

Pasados tres días de su traslado, se inició a un periodo de habituación de tres días, durante el cual las ratas fueron expuestas al caja donde se realizó el experimento procurando que ésta ocurriera en forma aleatoria para evitar que las ratas anticiparan el orden en que se les llevaría a la prueba, lo que podría causarles ansiedad.

En cada sesión, el animal se colocó en el centro del compartimento proximal con la vista hacia el compartimento del gato. Inmediatamente, el experimentador salió del cuarto y cerró la puerta de modo que entrara una mínima cantidad de luz exterior. Una vez terminados los diez minutos de la prueba, se retiró al animal de la caja y se limpiaron las paredes de ésta con Extrán®, seguido de una limpieza con etanol 70%. También se retiró el aserrín sucio y se reemplazó por aserrín nuevo (únicamente la zona donde se observó que el animal hubiera evacuado).

#### 8.5 Exposición a depredador

Al cuarto día, se colocó a la rata en la caja bajo las mismas condiciones que en la habituación, con la excepción de que previamente se colocó un gato macho adulto

en el compartimento del gato. La sesión fue videograbada para su posterior análisis.

Las ratas que corresponden a los grupos no condicionados fueron sacrificadas al finalizar esta prueba; las ratas correspondientes a los grupos condicionados permanecieron vivas hasta el día siguiente, en el que se realizó la prueba de retención.

#### 8.6 Prueba de retención

A las 24 hrs de que se expuso al animal a la caja con el gato, se llevó a cabo una nueva exposición de las ratas a la caja en donde fueron expuestas al gato bajo las mismas condiciones de tiempo, luz, humedad y temperatura, a excepción de que el gato estuvo ausente. La sesión fue videograbada para un análisis posterior.

Cabe señalar que esta reexposición nos permitió observar si el animal logró asociar tras una sola exposición el estímulo aversivo (el gato) con el entorno en el que se presentó éste (la caja).

#### 8.7 Análisis conductual

Las medidas espacio-temporales que se midieron al analizar el video se muestran en la Tabla 3.

Otras conductas que se midieron al analizar el video y cuyo número de episodios pudiera indicarnos el grado de ansiedad/miedo en el que se encuentra el animal se muestran en la Tabla 4. Dada la dificultad para evaluarlas individualmente y debido a la gran variabilidad que se observó entre los animales, con excepción del acicalamiento todas las conductas descritas bajo este apartado se analizaron conjuntamente bajo la denominación de Medidas de Evaluación del Riesgo.

| Medida                              | Descripción  |
|-------------------------------------|--|
| Tiempo de latencia                  | Tiempo que transcurre desde que la rata es colocada en el compartimento proximal hasta que entra en el túnel.        |
| Tiempo en el compartimento distal   | Tiempo total que la rata pasa en el compartimento distal. La rata debe tener las 4 patas dentro del compartimento.   |
| Tiempo en el túnel                  | Tiempo total que la rata pasa en el túnel. La rata debe tener las 4 patas dentro del compartimento.                  |
| Tiempo en el compartimento proximal | Tiempo total que la rata pasa en el compartimento proximal. La rata debe tener las 4 patas dentro del compartimento. |
| Transiciones                        | Número de veces que el animal cambia de compartimento.   |

Tabla 3. Medidas espacio-temporales. Elaborado por Rebeca Méndez H.

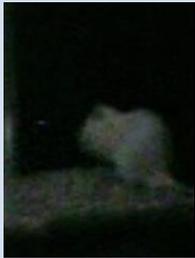
| Conducta                                    |   | Descripción   | Ejemplo   |
|---|---|---|---|
| Evaluación del riesgo                       | Cabeza afuera<br>( <i>Head out</i> )          | Se presenta cuando el animal se encuentra en el túnel y estira su cabeza hacia afuera con dirección al compartimento proximal.              |    |
|   | Estiramientos<br>( <i>stretch attend</i> )    | Se presenta cuando el animal tiene el cuerpo elongado con la espalda baja, al mismo tiempo que mira en dirección al compartimento del gato. |    |
|   | Aproximaciones<br>( <i>stretch approach</i> ) | Se presenta cuando la rata se mueve hacia el compartimento del gato, con el cuerpo elongado y la espalda baja.                              |  |
| Acicalamientos en el compartimento proximal |   | Número de veces que el animal se acicala. Se mide para cada uno de los compartimentos.  |  |

Tabla 4. Medidas de evaluación del riesgo. Elaborado por Rebeca Méndez H.

## 8.8 Perfusión y preparación de cerebros.

Pasando 85 minutos de la prueba conductual, se administró 0.8 mL de pentobarbital (sobredosis) para producir una analgesia rápida y potente. La perfusión se llevó a cabo 90 minutos después de las manipulaciones experimentales, ya que se sabe que en este tiempo el marcador de interés se encuentra en su mayor grado de expresión con respecto al estímulo (Kaczmarek & Chaudhuri 1997). La perfusión (1mL/g peso) se realizó por vía cardiaca introduciendo solución salina fría (NaCl 0.9%) a un flujo de 10ml/min. Posteriormente se fijó el tejido introduciendo por la misma vía y bajo las mismas condiciones una solución de paraformaldehído al 4%.

Una vez perfundidos los animales, se prosiguió a extraer los cerebros y a colocarlos en una solución de paraformaldehído 4% para terminar con la fijación. Pasadas 24 horas los cerebros fueron transferidos a soluciones con una concentración creciente de sacarosa para rehidratarlos y crioprotegerlos, de esta manera evitando que los cortes presentaran artefactos de congelación. Para ello, los cerebros se colocaron inicialmente en una solución de sacarosa 10% y cada 24 horas se cambiaron a soluciones de sacarosa con una concentración creciente: 20% y 30%. Posteriormente, se obtuvieron rebanadas de cerebro en sentido antero-posterior con un grosor de 40  $\mu$ m utilizando un criostato mantenido a -20°C. Los cortes recolectados correspondieron a la amígdala y abarcaron aproximadamente una distancia que va desde -1.60 a -3.60mm respecto al bregma. Los cortes se recolectaron en una caja de pozos que contenía solución salina amortiguada con fosfatos (PBS: NaCl 0.9%, pH=7.2, 0.1M) muestreando 1 en 5, es decir, cinco cortes consecutivos fueron recolectados en uno de 5 pozos consecutivos cada uno, mientras que el sexto se recogió de nuevo en el primer pozo y así consecutivamente. De esta manera, cada pozo contenía cortes con una separación de 200  $\mu$ m. Los cortes se guardaron a 4°C hasta ser procesados por métodos inmunohistoquímicos.

## 8.9 Inmunohistoquímica

Material proveniente de un solo pozo, conteniendo secciones representativas de toda la amígdala, fue procesado inmunohistoquímicamente para EGR-1. La inmunohistoquímica se realizó utilizando el sistema ABC (Vector systems®). Para esto, se incubaron los cortes primeramente en el anticuerpo primario, un anticuerpo policlonal de conejo vs. EGR-1 (Sigma-Aldrich®) diluido 1:1000, durante 72 horas, a 4°C con agitación suave y continua. Luego se lavaron con PBS (amortiguador de fosfatos 0.1 M; NaCl 0.9%; pH 7.2) por 10 minutos, por triplicado. A continuación se incubaron en el anticuerpo secundario (Vector systems®), un anticuerpo anti-conejo biotinilado diluido 1:200, durante 2 hrs a temperatura ambiente, en agitación suave. Enseguida se realizó un lavado con PBS por 10 minutos por triplicado y los cortes se incubaron en el complejo AB (complejo avidina-biotina-peroxidasa 1:1 pre incubado 2 hrs antes) durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente los cortes se lavaron de la misma manera y se colocaron en un cristizador con buffer (tris 0.05M, pH 7.2) y una pequeña cantidad de diaminobencidina. Los cortes se preincubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, después de los cuales se agregaron 35µL de peróxido de hidrógeno glacial. La incubación se continuó hasta observar una coloración café que indicó que la reacción se llevó a cabo adecuadamente. El tiempo de incubación máximo fue de 15 minutos. Enseguida, se retiraron los cortes de cerebro del medio y se lavaron con PBS durante 10 minutos, por triplicado. Los cortes se guardaron en PBS a 4°C hasta su montaje en un portaobjetos.

El montaje de los cortes sobre un portaobjetos se realizó utilizando una solución de gelatina 1g/L y alcohol al 40%. Posteriormente se realizó una deshidratación de los cortes de cerebro adheridos a los portaobjetos mediante la colocación de éstos en etanol a diferentes concentraciones y finalmente en xilol puro. Para ello el tejido fue colocado durante dos minutos en agua, después 4 minutos en etanol 70%, seguido de 4 minutos en etanol 97%. Posteriormente los cortes fueron colocados sucesivamente en etanol al 90% y 100% durante 4 minutos seguido de 2 minutos en una mezcla de etanol (100%) y xilol también al 100%. Finalmente, los

portaobjetos conteniendo los cortes fueron sumergidos en xilol por 4 minutos. Después de esto se cubrió el tejido con Permount ® y un cubreobjetos. Se dejó secar para observarlos posteriormente al microscopio.

#### 8.10 Estereología

Se utilizó un microscopio óptico (Olympus BX15 ®) para observar el tejido y una cámara acoplada (Cool SNAPPPro cf color®) para tomar las fotografías pertinentes. Se localizaron los núcleos que presentaban inmunoreactividad para EGR-1 y se contaron las células positivas mediante el programa ImagePro. El conteo celular se realizó dentro de la amígdala, en los núcleos central, lateral, basal y medial y en algunos casos, (solamente en el corte correspondiente a -1.78 mm con respecto al bregma) en la isla intercalada principal. El conteo se realizó unilateralmente en 4 cortes consecutivos separados entre sí por 200µm y que cubren una distancia que va desde -1.78 a -2.45 mm con respecto al bregma. Para ser consideradas como positivas, las células debían poseer una silueta distinguible del fondo. El conteo se realizó con ayuda de una rejilla de 40x40 µm<sup>2</sup> que en su centro contenía un cuadro de 10x10 µm<sup>2</sup>. Se contaron únicamente aquellas células que se encontraban dentro del cuadro o en intersección con su perímetro.

Se realizó la estimación del número de núcleos positivos para cada núcleo por medio del método del fraccionador óptico (Howard & Reed 1998) . Para ello se realizó el cálculo del número estimado de células positivas para EGR-1 mediante la siguiente ecuación:

$$\widehat{N} = Q \cdot \frac{1}{hsf} \cdot \frac{1}{asf} \cdot \frac{1}{ssf}$$

Donde: Q corresponde al número de células contadas.

*hsf* corresponde a la altura de la fracción muestreada.

*asf* corresponde al área de la fracción muestreada.

*ssf* corresponde al muestreo utilizado, en este caso 1/5.

La altura de la fracción muestreada se calculó mediante la ecuación:

$$h_s f = \frac{h}{T}$$

Donde:  $h$  corresponde a la altura del disector, en este caso de las células y

$T$  corresponde al grosor de la sección.

En este caso se consideró únicamente una célula por plano, por lo que se consideró que el grosor de la célula es igual al grosor de la sección. Haciendo esta consideración, la relación  $h/T$  es igual a uno.

El área de la fracción muestreada se calculó mediante la ecuación:

$$a_s f = \frac{\frac{a}{f}}{(\Delta x \times \Delta y)}$$

Donde :

$a/f$  corresponde el área de la cuadrícula utilizada para contar. En este caso se utilizó una cuadrícula de  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ .

$(\Delta x \times \Delta y)$  corresponde el área de la rejilla utilizada. En este caso,  $40 \times 40 \mu\text{m}^2$ .

Sustituyendo los valores en las ecuaciones anteriores, se obtiene:

$$\widehat{N} = Q \cdot 1 \cdot 16 \cdot 5$$

## 8.11 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism 5®.

En todos los casos, se observó que los grupos control (control no condicionado y control condicionado) eran estadísticamente iguales para todas las variables. En vista de lo anterior y dado que la única diferencia experimental entre ellos fue el número de días que fueron expuestos a la caja sin el gato (el control condicionado fue expuesto un día más) se consideró conveniente agruparlos dentro de un solo grupo control.

### 8.11.1 Conducta.

Para las medidas espacio-temporales se utilizó estadística paramétrica para evaluar las diferencias entre los grupos. Se realizó el análisis de varianza de una vía (ANDEVA) y como prueba *post hoc* se utilizó la prueba de Dunnet.

En el caso de las medidas conductuales, debido a que los grupos no mostraban una distribución normal, el análisis se llevó a cabo mediante la prueba de Kruskal Wallis. En caso de haber diferencias, se realizó la prueba de Mann-Whitney para aislar el efecto.

### 8.11.2 Conteo celular

El análisis estadístico de los resultados del conteo celular se llevó a cabo mediante una ANDEVA de una vía y la prueba de Tukey como *post hoc*.

## Capítulo 9. Resultados

### 9.1 Conducta.

En general se observó, en los animales experimentales, aumento en la evitación a los espacios de la caja asociados al depredador y a las conductas relacionadas con la evaluación del riesgo con respecto a los controles, tanto durante la adquisición (conducta no condicionada) como tras la evocación de la conducta condicionada.

#### *Medidas espacio-temporales.*

De acuerdo a lo esperado, el tiempo que las ratas permanecieron en el compartimento proximal al gato (Figura 7) disminuyó significativamente con respecto al que mostraron los animales control tanto para el grupo no condicionado como el condicionado (*ANDEVA*  $F=6.52$ ;  $P=0.0029$ ). En congruencia con lo ocurrido en el compartimento proximal, el tiempo que las ratas permanecieron en el compartimento distal (Figura 8) se incrementó significativamente en ambas condiciones con respecto a sus controles (*ANDEVA*  $F=5.616$ ;  $P=0.0061$ ), lo que demuestra aumento en la evitación a su depredador. En contraste con lo anterior, el tiempo que las ratas permanecieron en el túnel (Figura 9) fue prácticamente idéntico para todos los grupos (*ANDEVA*  $F=0.05699$ ;  $P=0.9447$ ). De la misma manera, el número de transiciones entre compartimentos (Figura 10) fue muy parecido ( $F=0.2864$ ;  $P=0.2864$ ). En relación a la latencia (Figura 11), a pesar de que se observó una tendencia a su aumento en ambos grupos con respecto al grupo control, ésta no resultó estadísticamente significativa (*ANDEVA*  $F=1.984$ ;  $P=0.1476$ ).

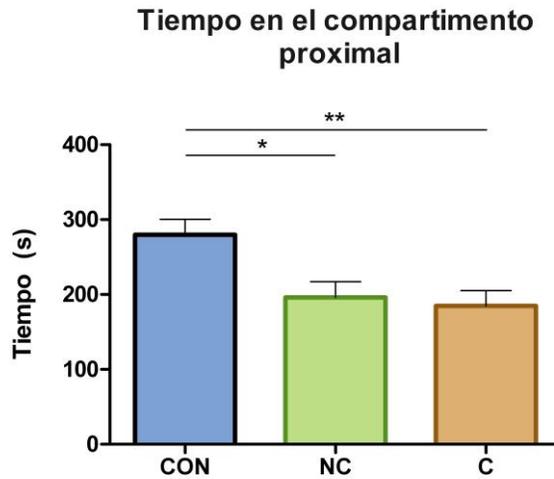


Figura 7. Tiempo de permanencia en el compartimento proximal. Se muestra la media  $\pm$  el error estándar para cada uno de los grupos. *Prueba de Dunnet* \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . Grupo control (CON)  $n=24$ ; Grupo no condicionado (NC)  $n=14$ ; Grupo condicionado (C)  $n=16$ .

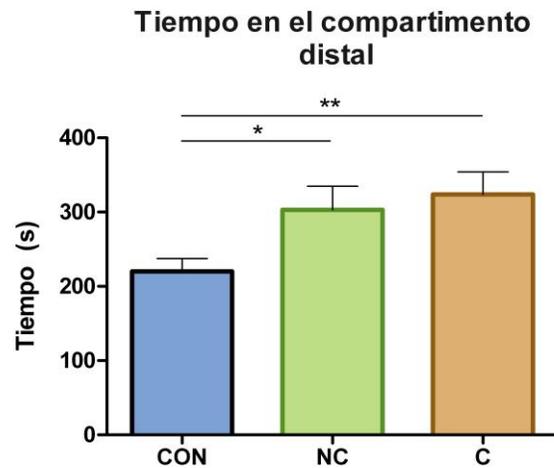


Figura 8. Tiempo de permanencia en el compartimento distal. Se muestra la media  $\pm$  el error estándar para cada uno de los grupos. *Prueba de Dunnet* \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . Grupo control (CON)  $n=24$ ; Grupo no condicionado (NC)  $n=14$ ; Grupo condicionado (C)  $n=16$ .

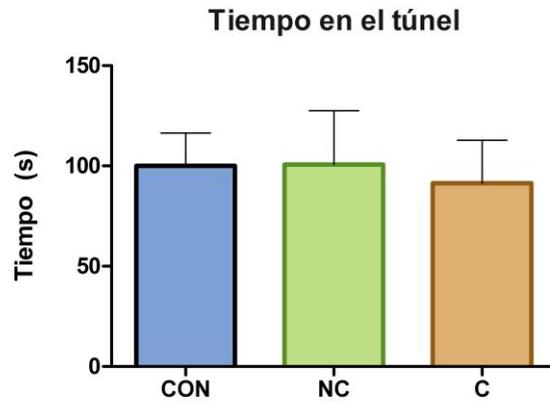


Figura 9. Tiempo de permanencia en el túnel. Se muestra la media  $\pm$  el error estándar para cada uno de los grupos. No hay diferencias entre los grupos y el control, (*ANDEVA*  $p > 0.05$ ). Grupo control (CON)  $n=24$ ; Grupo no condicionado (NC)  $n=14$ ; Grupo condicionado (C)  $n=16$ .

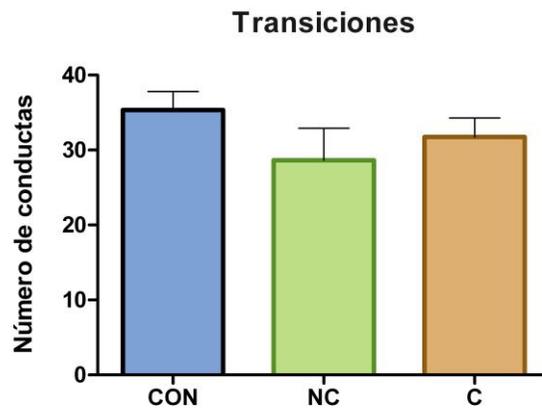


Figura 10. Número de transiciones. Se muestra la media y el error estándar para cada uno de los grupos. No hay diferencias entre los grupos y el control, (*ANDEVA*  $p > 0.05$ ). Grupo control (CON)  $n=24$ ; Grupo no condicionado (NC)  $n=14$ ; Grupo condicionado (C)  $n=16$ .

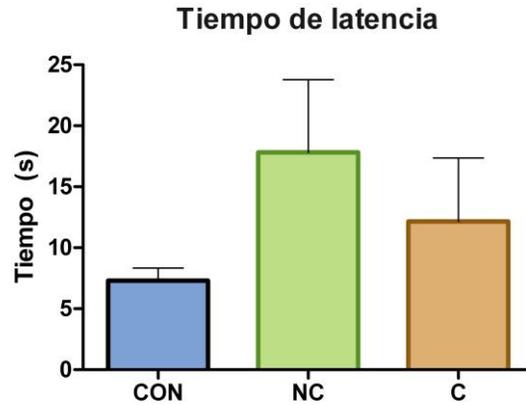


Figura 11. Tiempo de latencia. Se muestra la media  $\pm$  el error estándar para cada uno de los grupos. No hay diferencias entre los grupos y el control, (ANDEVA  $p>0.05$ ). Grupo control (CON)  $n=24$ ; Grupo no condicionado (NC)  $n=14$ ; Grupo condicionado (C)  $n=16$ .

#### *Medidas de Evaluación del riesgo.*

El número de los episodios de las conductas de evaluación del riesgo (Figura 12) aumentó significativamente con respecto al grupo control tanto para el grupo no condicionado como el condicionado (*Kruskall Wallis*  $P=0.0099$ ). En congruencia con lo anterior, el número de acicalamientos ocurridos en la caja proximal (Figura 13) disminuyó significativamente con respecto al control tanto para el grupo no condicionado como el condicionado (*Kruskall Wallis*  $P=0.0197$ ).

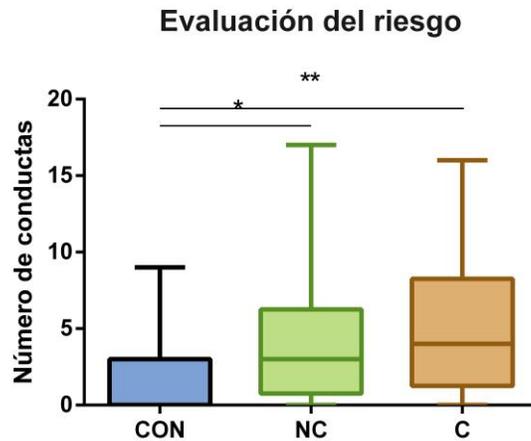


Figura 12. Número de episodios de conductas de evaluación del riesgo. La línea representa la mediana y las barras muestran el rango de valores para cada uno de los grupos; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . Prueba *Mann Whitney* (CON vs. NC)  $P = 0.0462$ ; *Mann Whitney* (CON vs. C)  $P = 0.0032$ . Grupo control (CON)  $n = 24$ ; Grupo no condicionado (NC)  $n = 14$ ; Grupo condicionado (C)  $n = 16$ .

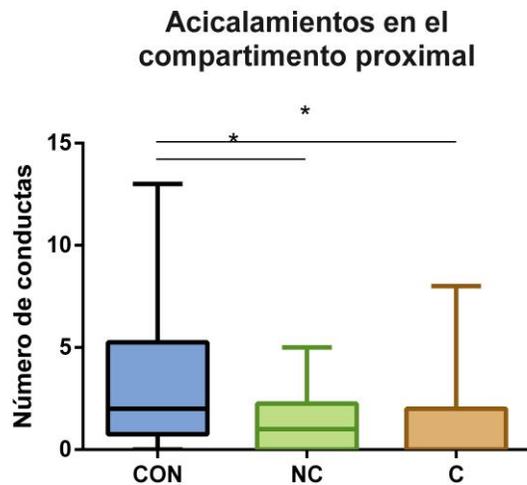


Figura 13. Número de acicalamientos en el compartimento proximal. La línea representa la mediana y las barras muestran el rango de valores para cada uno de los grupos. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . Prueba *Mann Whitney* (CON vs. NC)  $P = 0.0432$ ; *Mann Whitney* (CON vs. C)  $P = 0.0119$ . Grupo control (CON)  $n = 24$ ; Grupo no condicionado (NC)  $n = 14$ ; Grupo condicionado (C)  $n = 16$ .

## 9.2 Expresión de EGR-1

Los resultados de la expresión de EGR-1 en los distintos núcleos de la amígdala se muestran en las Figuras 14- 18. Como puede observarse en ellas, la exposición de las ratas a un gato (miedo no condicionado) no fue capaz de modificar el número de células inmunopositivas para EGR-1 tanto en el LA (Figura 14) como en el BA (Figura 15), CeA (Figura 16) y MeA (Figura 17) con respecto al grupo control. Por el contrario, en la isla intercalada principal se encontró una tendencia de aumento en la expresión de EGR-1 (Figura 18), aunque esta tendencia no fue significativa.

En contraste con los resultados anteriores, la expresión de EGR-1 se incrementó significativamente en el grupo de animales condicionados cuando se expusieron al contexto asociado al depredador tanto en el LA (Figura 14) como el BA (Figura 15), pero no en el CeA (Figura 16) y el MeA (Figura 17). Como en el caso del grupo no condicionado, se encontró aumento significativo en la expresión de EGR-1 en la isla intercalada principal (Figura 18).

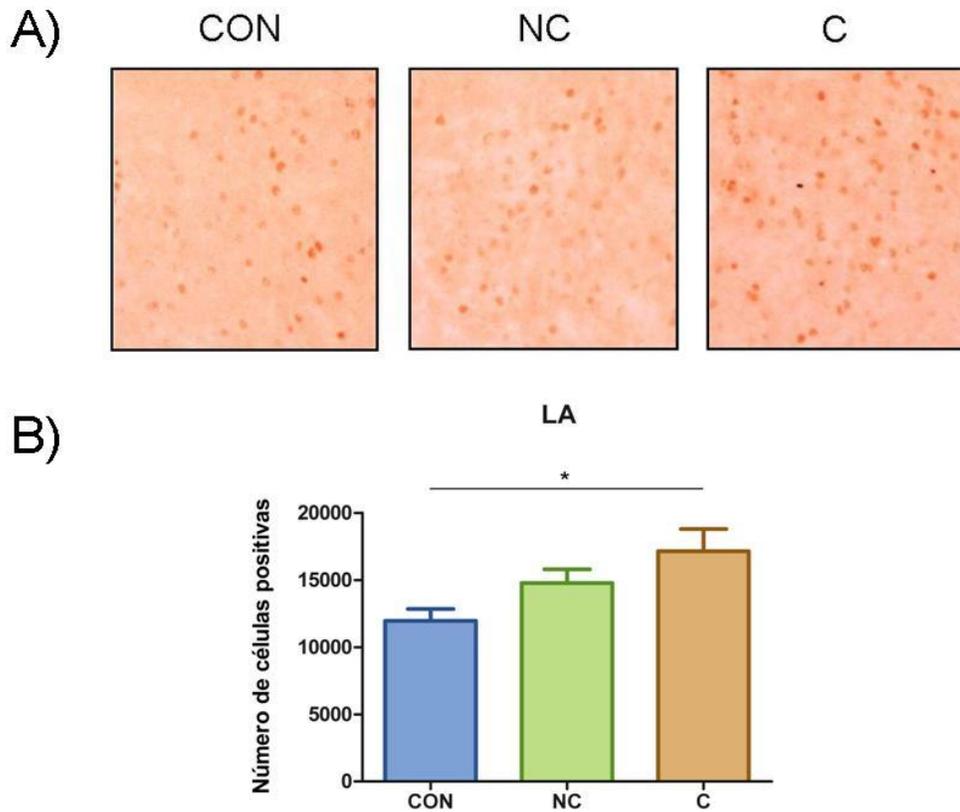


Figura 14. Expresión de EGR-1 en el núcleo lateral de la amígdala. A) Fotografías representativas del LA para cada uno de los grupos. B) Estimado del número de células inmunopositivas para EGR-1 en el LA. Se muestra la media  $\pm$  el error estándar para cada uno de los grupos. Análisis estadístico: ANDEVA  $F_{2,15}=5.119$ ,  $P < 0.05$ ; *Prueba Tukey*  $*p < 0.05$ . Grupo control (CON)  $n=8$ ; Grupo no condicionado (NC)  $n=4$ ; Grupo condicionado (C)  $n=6$ .

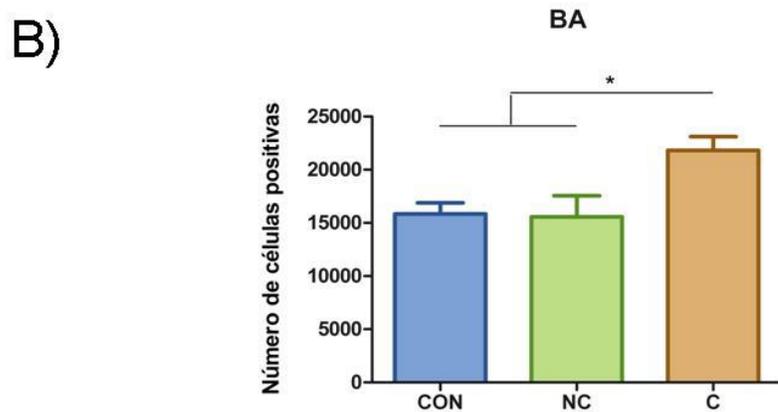
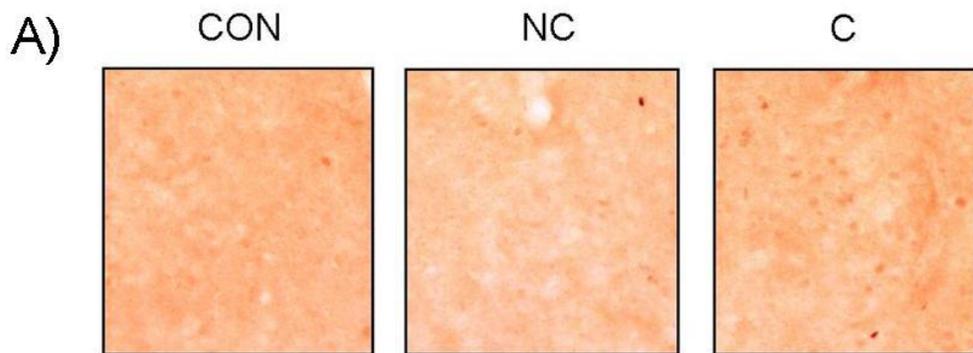


Figura 15. Expresión de EGR-1 en el núcleo basal de la amígdala. A) Fotografías representativas del BA para cada uno de los grupos. B) Estimado del número de células inmunopositivas para EGR-1 en el BA. Se muestra la media  $\pm$  el error estándar para cada uno de los grupos. Análisis estadístico: ANDEVA  $F_{2,15} = 7.068$ ,  $P = 0.0069$ ; Prueba Tukey  $*p < 0.05$ . Grupo control (CON)  $n = 8$ ; Grupo no condicionado (NC)  $n = 4$ ; Grupo condicionado (C)  $n = 6$ .

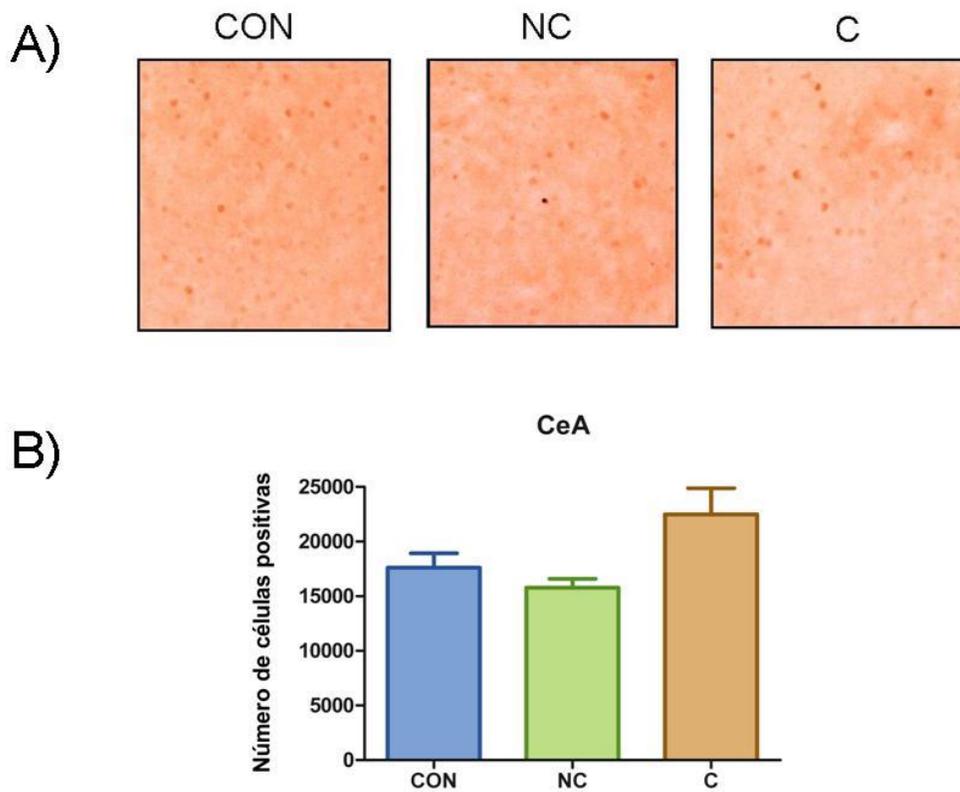


Figura 16. Expresión de EGR-1 en el núcleo central de la amígdala. A) Fotografías representativas del CeA para cada uno de los grupos. B) Estimado del número de células inmunopositivas para EGR-1 en el CeA. Se muestra la media  $\pm$  el error estándar para cada uno de los grupos. Análisis estadístico: (ANDEVA  $F_{2,15}=3.495$ ;  $P=0.0568$ ). Grupo control (CON)  $n=8$ ; Grupo no condicionado (NC)  $n=4$ ; Grupo condicionado (C)  $n=6$ .

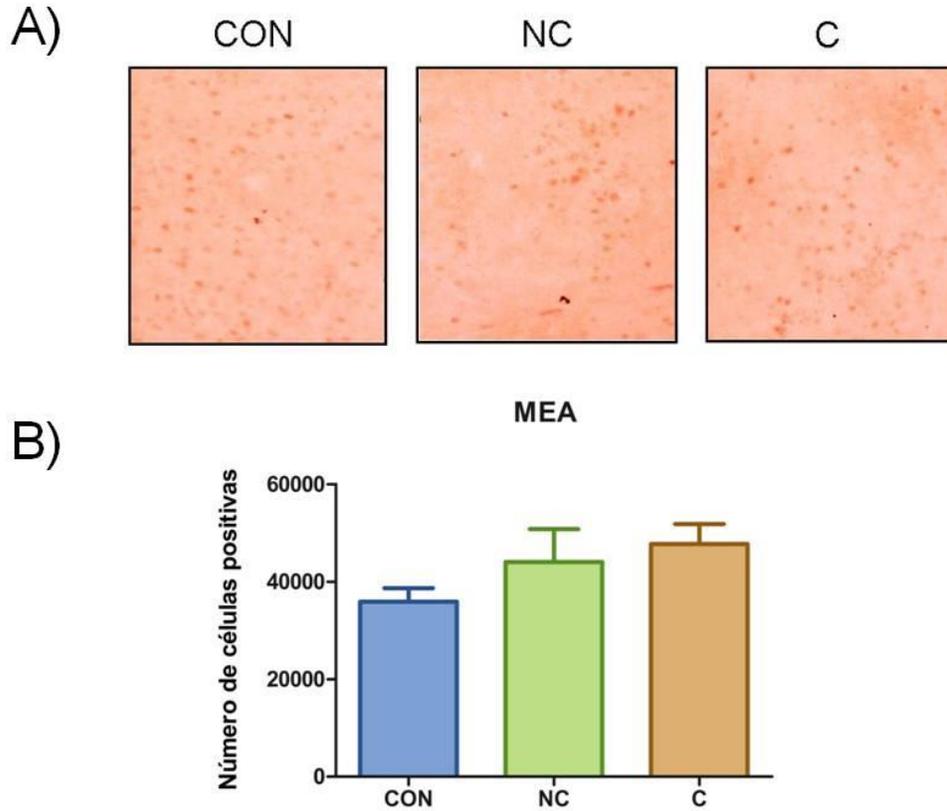


Figura 17. Expresión de EGR-1 en el núcleo medial de la amígdala. A) Fotografías representativas del MeA para cada uno de los grupos. B) Estimado del número de células inmunopositivas para EGR-1 en el MeA. Se muestra la media  $\pm$  el error estándar para cada uno de los grupos. Análisis estadístico: (ANDEVA  $F_{2,15}=2.560$ ;  $P=0.1106$ ). Grupo control (CON)  $n=8$ ; Grupo no condicionado (NC)  $n=4$ ; Grupo condicionado (C)  $n=6$ .

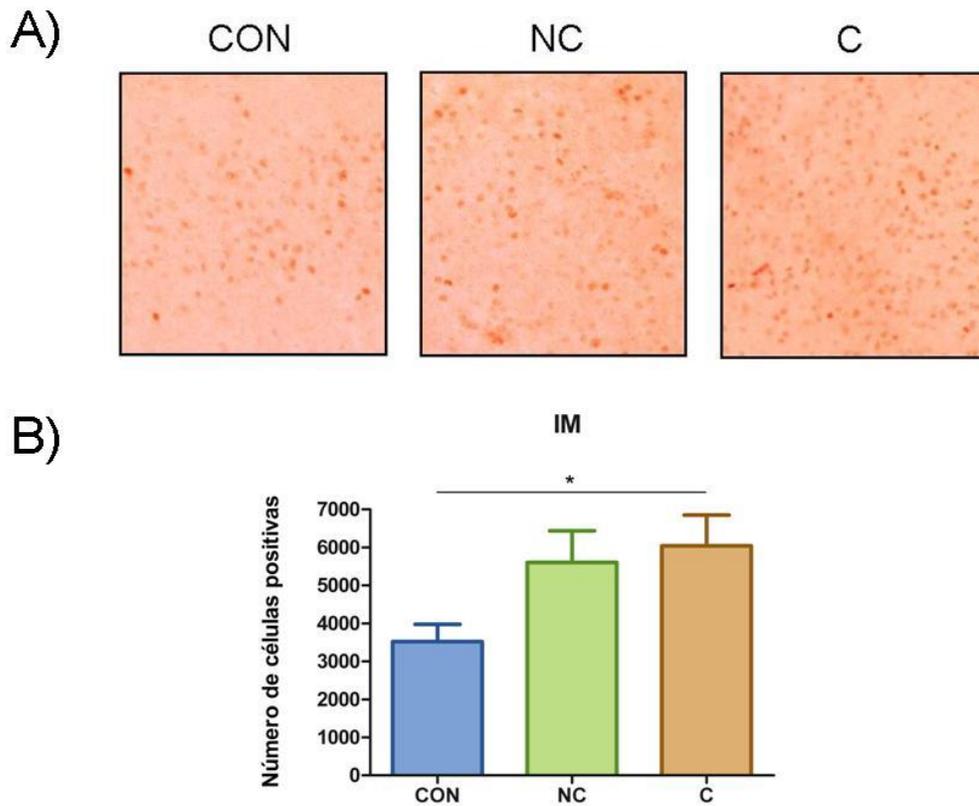


Figura 18. Expresión de EGR-1 en la isla intercalada principal de la amígdala. A) Fotografías representativas de la IM para cada uno de los grupos. B) Estimado del número de células inmunopositivas para EGR-1 en la IM. Se muestra la media  $\pm$  el error estándar para cada uno de los grupos (ANDEVA  $F_{2,15}=4.680$ ;  $P=0.0263$ ). Prueba de Tukey  $*p<0.05$ . Grupo control (CON)  $n=8$ ; Grupo no condicionado (NC)  $n=4$ ; Grupo condicionado (C)  $n=6$ .

## Capítulo 10. Discusión y conclusiones.

### 10.1 Discusión

#### 10.1.1 Consideraciones conductuales.

El análisis conductual realizado indica que tras de la exposición de las ratas a un gato, utilizando el dispositivo anteriormente descrito, éstas permanecen por menos tiempo en aquellos espacios alejados de su depredador natural (compartimiento proximal, en este estudio) y se recluyen en el espacio más protegido (compartimiento distal) que les ofrece la caja utilizada. Adicionalmente, las ratas exhiben simultáneamente una serie de conductas que les permite evaluar el riesgo al que han sido sometidas, tales como la exploración de los espacios proximales al depredador (*cabeza afuera* o *head out*), así como elongaciones (*stretch attend*) y/o aproximaciones (*stretch approach*) dirigidas al depredador. Asimismo, las ratas reducen aquellas conductas que se consideran típicamente como no defensivas tales como el acicalamiento (Robert J Blanchard & Blanchard 1989). En cambio, no se observaron modificaciones en la locomoción ni la aparición de la conducta de congelamiento (*freezing*). Dado que las conductas anteriores, incluyendo el congelamiento, disminuyen tras la administración de algunas benzodiazepinas (Blanchard, Blanchard, et al. 2005) se considera que son conductas adaptativas (ansiedad/miedo) que tienden a proteger al roedor en contra de su depredador natural. Además, estas conductas constituyen un índice de la ansiedad que experimenta el roedor, como ha sido puesto en evidencia tras su exposición subsecuente al laberinto elevado en forma de “+” (Adamec & Shallow 1993).

Aunque en el presente trabajo la conducta exhibida por las ratas fue similar a la reportada en experimentos en donde los animales son expuestos a un gato (Martinez et al. 2011), difirió de ellos en cuanto a la ausencia de congelamiento. La razón por la cual el congelamiento, que es tan aparente en el modelo de exposición a depredador, no se presentó en estos experimentos pudiera estar ligada al diseño del dispositivo empleado, pues en este caso, aunque tanto las

ratas como el gato coexistieron temporalmente en el dispositivo usado, estuvieron separados por una pared perforada que limitaba las interacciones entre ellos. Es muy probable, entonces, que dada la escasa agudeza visual de los roedores (Burn 2008), la interacción entre ellos haya sido esencialmente olfativa, como lo sugiere la falta de congelamiento que se ha observado en aquellos modelos en los que los animales estuvieron únicamente expuestos, ya sea a un collar (R. A. Dielenberg et al. 2001) o una tela (Blanchard et al. 2001; Li et al. 2004; Takahashi et al. 2007; Zangrossi & File 1992) impregnados con el olor de un gato. Adicionalmente, dado que la conducta de un animal depende de la distancia entre el estímulo y el animal, predominado las respuestas de evitación y evaluación del riesgo sobre las de congelamiento cuando las distancias entre el estímulo y el animal en riesgo son grandes o existe la posibilidad de escape (Robert J Blanchard & Blanchard 1989) (como en el dispositivo empleado en este trabajo), no es sorprendente que no se haya presentado en estos experimentos el congelamiento.

Finalmente, es importante enfatizar que las conductas descritas anteriormente no solo se presentaron durante la exposición de las ratas al gato, en donde el animal experimenta un alto grado ansiedad no condicionada (Adamec & Shallow 1993) sino también 24 horas después, cuando esta conducta se evoca en ausencia del gato. Esto sugiere que bajo las condiciones usadas en este trabajo, el animal se ha condicionado al contexto como ha sido sugerido por (Blanchard et al. 2001).

#### 10.1.2 Expresión de EGR-1 en el miedo condicionado y no condicionado en este trabajo vs otros estudios reportados.

Dado que ha sido reportado que EGR-1 tiene un papel importante en las plasticidad sináptica y particularmente en aquella asociada con el miedo condicionado (Knapska & Kaczmarek 2004; Alberini 2009), el objetivo de este trabajo fue estudiar si la expresión de EGR-1 es diferente en el miedo condicionado vs el no condicionado. Para ello se utilizó el modelo de exposición a depredador y se asumió que el animal experimenta miedo no condicionado (innato) en el momento en que es expuesto a su depredador, y condicionado

cuando este es evocado 24 horas después en ausencia del gato. Usando este modelo, se cuantificó durante ambas fases el número de células inmunoreactivas para esta proteína en diferentes núcleos amigdalinos, entre los que se incluye por primera vez a la isla intercalada principal (IM).

Los resultados de este trabajo muestran que en comparación con el grupo control, que nunca estuvo en presencia del gato pero sí del dispositivo empleado, la proteína EGR-1 incrementó su expresión durante la evocación del miedo condicionado pero no durante la exposición de las ratas a su depredador, en donde predominan las manifestaciones de miedo no condicionado. Dicho incremento diferencial no fue general sino que solo se observó en los núcleos LA, BA y la IM. Cabe destacar, sin embargo, que la expresión de EGR-1 en la isla intercalada principal, a diferencia de lo que ocurrió en el LA y el BA aumentó notablemente tanto durante la expresión del miedo no condicionado como el condicionado; aunque este aumento, muy probablemente debido a la variabilidad encontrada, solo resultó significativo tras la evocación del miedo condicionado.

La expresión de EGR-1 en los modelos de exposición al gato ha sido solo estudiada por Rosen et al. (2005) quien utilizó como modelo una arena de grandes dimensiones (1,52 x 1.83 m) en donde las ratas fueron expuestas a un gato vivo que se encontraba suelto dentro de la arena. Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por estos investigadores, ya que como en nuestro caso tampoco reportaron cambios cuantitativos en la expresión de EGR-1 en el LA ni en resto de los núcleos amigdalinos aunque en este último caso sus observaciones, a diferencia de las nuestras, solo fueron cualitativas. Por otro lado, nuestros resultados difieren de los de Asok et al. (2013), quienes usando un enfoque diferente al nuestro (la exposición de las ratas a TMT), detectaron un aumento en la expresión de EGR-1 en el CeA. Sin embargo, resulta difícil interpretar este resultado, pues aunque los zorros son también depredadores naturales de las ratas, el efecto del TMT, debido a su olor tan pútrido, pudiera más bien estar relacionado con una aversión a sus propiedades organolépticas y no con el miedo que los roedores sienten ante su depredador. Dada la ausencia de información en la literatura, no fue posible comparar nuestros resultados con los obtenidos por

otros laboratorios en torno a los efectos de la evocación de la conducta del miedo condicionado a depredador.

### 10.1.3 Expresión de EGR-1 en el miedo condicionado y no condicionado en el modelo de exposición a depredador vs otros modelos.

Nuestros resultados difieren significativamente con los obtenidos en otros modelos de condicionamiento (Rosen et al. 1998; Malkani & Rosen 2000b; Maddox et al. 2011) pues a diferencia de lo que ocurrió en todos ellos en nuestro caso no se encontraron cambios en la expresión de EGR-1 en el LA durante la adquisición del miedo condicionado, representada bajo nuestras condiciones por la exposición aguda de los roedores a un gato. Dichos resultados sugieren que el mecanismo que sigue el condicionamiento a depredador es diferente del que se observa con el condicionamiento clásico, en el que el estímulo condicionado (un tono o una luz) se acopla a un choque eléctrico. Cabe señalar, sin embargo, que durante la exposición al gato la falta de cambios en la expresión de EGR-1 observada en nuestros experimentos también fue observada en el BLA y CeA por aquellos autores, que como nosotros, condicionaron a los animales al contexto (Rosen et al. 1998; Malkani & Rosen 2000b) y no a una señal discreta (*cue*). Dicha similitud fue parcialmente revertida durante la evocación, pues en este caso el aumento en la expresión de EGR-1 que observamos en el LA y BLA coincide con lo reportada en aquellos experimentos en los que los animales fueron condicionados a una señal discreta (*cue*) y no al contexto. Sin embargo, tanto en nuestros experimentos como los de Rosen et al. (1998) y Malkani & Rosen (2000) no se observaron cambios en la expresión de EGR-1 en el CeA durante la evocación cuando los animales fueron condicionados al contexto.

La razón de estas diferencias, que ponen en evidencia la existencia de diferentes mecanismos operantes entre el miedo incondicionado y el condicionado, pudiera estar relacionada con la naturaleza o importancia del estímulo incondicionado (un depredador que pone en riesgo la vida vs un estímulo simplemente aversivo como un choque eléctrico), el tipo de condicionamiento (a una señal visual o auditiva vs

al contexto) que se produce en cada prueba y sobre todo la vía que sigue la información y su procesamiento en cada paradigma.

Los estudios realizados con modelos de condicionamiento en donde estímulos auditivos son apareados a un choque eléctrico, han mostrado que estímulos emocionalmente relevantes provenientes del tálamo y la corteza cerebral alcanzan al complejo basolateral de la amígdala y que tras de su procesamiento local son enviados al CeA en donde se implementa una respuesta ansiogénica apropiada (véase para una revisión sobre el tema (Palomares-Castillo et al. 2012; Ledoux 2000; Pare & Duvarci 2012; Ehrlich et al. 2009). De acuerdo a este esquema, existiría una relación lineal entre el núcleo lateral, en donde se dan cita los estímulos condicionados y los no condicionados generando la plasticidad requerida para el condicionamiento, y el núcleo central, donde se implementarían las respuestas autonómicas, hormonales y conductuales características de la ansiedad. Por otro lado, asociada a estímulos que demandan atención inmediata para la sobrevivencia de un sujeto, se ha supuesto la existencia de una vía corta, en donde los estímulos aversivos llegan directamente al CeA. Es claro que la exposición a un depredador requiere de respuestas reflejas, capaces de preservar la vida de un individuo ante su depredador pero también de respuestas más complejas que le permitan en un futuro anticipar su presencia; por lo que la existencia de una “vía corta” y una “vía larga” podría aplicarse también para el modelo de exposición a depredador.

Nuestros resultados indican, sin embargo, que el mecanismo involucrado en el miedo por exposición a depredador difiere sustancialmente del modelo anterior pues, en contra de lo que se esperaría de acuerdo a él, no se encontraron cambios en la expresión de EGR-1 en el LA tras ser expuestas al gato (miedo no condicionado), sugiriendo que dicha exposición no genera plasticidad en ese núcleo. En apoyo de lo anterior, experimentos de lesión (Martinez et al. 2011) han demostrado que la destrucción del CeA carece de efectos en la conducta que se observa en los animales tras la exposición a su depredador, sugiriendo que en este paradigma no existe una relación lineal entre el LA y el CeA como el modelo tradicional lo sugiere.

#### 10.1.4 Flujo de información sugerido para el modelo de exposición a depredador.

Las diferencias encontradas entre el paradigma de exposición a depredador con respecto a las predicciones sugeridas por el modelo tradicional no resultan sorprendentes si se considera que a lo largo de la evolución de las especies, presa y depredador siempre han coexistido; por lo que muchas de las estructuras participantes en la detección del depredador y su afrontamiento corresponden a estructuras filogenéticamente más antiguas como aquellas relacionadas con el olfato. Así, como consecuencia de lo anterior, los estímulos condicionado (contexto) y no condicionado (esencialmente el olor del gato) no se darían cita en el núcleo lateral, que es una estructura cortical filogenéticamente más reciente. Por otro lado, el papel que tiene el CeA en la implementación de las respuestas de ansiedad en el modelo tradicional parece ejercerse en el modelo de exposición a depredador (o a su olor) a nivel del MeA que es evolutivamente más antiguo que el CeA, ya que como ha sido señalado antes, la destrucción del CeA no abole las respuestas de afrontamiento a un depredador pero sí lo hace la destrucción del MeA (Martinez et al. 2011; Blanchard et. al. 2005; Canteras, et al. 2005)

Aunque no es posible delinear con precisión las interacciones anatómicas que operan durante la exposición de un roedor a su depredador, se sugiere que la información feromonal proveniente del órgano vomeronasal es procesada en el bulbo olfatorio accesorio y enviada al MeA (Takahashi 2014), que como el CeA tiene la capacidad de implementar una respuesta ansiogénica (Luiten et al. 1985). Cabe señalar, que bajo condiciones de apremio, esta vía pudiera representar la contrapartida de la vía corta sugerida para la expresión de las manifestaciones del miedo no condicionado en el modelo tradicional. Ya que los resultados de este estudio muestran que no existen cambios en la expresión de EGR-1 en el MeA, pero se ha reportado un aumento de la expresión de c-fos (Martinez et al. 2011) que es esencialmente un marcador de actividad neuronal, en dicho núcleo tras la exposición de los roedores a un gato, es posible que el papel del MeA en este modelo sea implementar respuestas de ansiedad pero no ser un sitio de plasticidad asociada a la experiencia con el depredador. Dado que en el modelo tradicional se ha demostrado que aparte de la plasticidad generada en el LA existe

plasticidad en el CeA e incluso en las islas intercaladas (Samson & Paré 2005; Royer & Paré 2002), es posible que la plasticidad inherente a nuestro modelo también ocurra en una forma más distribuida como es sugerido por los resultados de este estudio, ya que se encontró un aumento en la expresión de EGR-1 en el LA, BLA e IM durante la evocación.

Estudios anatómicos han puesto en evidencia la existencia de proyecciones bidireccionales entre el hipocampo con el MeA y el bulbo olfatorio accesorio (McDonald 1998; Shipley & Adamek 1984), así como del hipocampo hacia el complejo basolateral de la amígdala y particularmente hacia el BA (van Groen & Wyss 1990). Adicionalmente, experimentos de lesión han mostrado que tras la destrucción del hipocampo ventral en roedores, las conductas que éstos exhiben típicamente ante su depredador o a un contexto asociado (incluyendo aquellas de evaluación del riesgo) se pierden (Pentkowski et al. 2006). En virtud de lo anterior, dado que el modelo de exposición a depredador (o a su olor) es un modelo de condicionamiento al contexto y dada la importancia del hipocampo en este tipo de condicionamiento (Selden et al. 1991) es tentador sugerir que dicha estructura pudiera ser un sitio de gran importancia para la generación de plasticidad asociada con el miedo a un depredador. La importancia de la potenciación a largo plazo que subyace a la instalación de cambios plásticos en esta estructura da apoyo a la sugerencia anterior. Es claro, sin embargo, que para apoyar esta sugerencia se requiere de estudios posteriores que pongan en evidencia si, bajo las condiciones empleadas en este trabajo, existe un incremento de la expresión de EGR-1 en el hipocampo.

El incremento en la expresión de EGR-1 encontrado en este trabajo en el LA como y el BA (que constituyen el complejo basolateral) durante la evocación resulta difícil de explicar, ya que como se discutió antes, dichos núcleos parecen tener una importancia relativamente menor en la adquisición del miedo condicionado en el modelo de exposición a un depredador. Sin embargo, es posible que aunque las memorias generadas en este modelo no se almacenen directamente en el LA/BA sino el hipocampo u alguna otra región, estos núcleos sean los encargados de darles la valencia emocional a las memorias, como ha sido sugerido por Davis

(2001) antes de que la información sea enviada al MeA para la implementación de las respuestas de ansiedad apropiadas. En apoyo de esta sugerencia, cabe señalar que son bien conocidas las proyecciones del hipocampo al complejo basolateral (van Groen & Wyss 1990) y de éste hacia el MeA (McDonald 1998). Mas aún, dadas las conexiones que la corteza prefrontal mantiene con el complejo basolateral (McDonald 1998), podría sugerirse que, aparte de modularse emocionalmente, estas memorias son también moduladas cognoscitivamente. Finalmente, dado que en el modelo tradicional las islas intercaladas incluyendo a la IM controlan a manera de interfaz el flujo de información del LA al CeA, es posible que la plasticidad sugerida por el aumento en la expresión de EGR-1 en la IM tras la exposición a un depredador (o a su olor), esté relacionada con el control del paso de información del BLA al MeA, que en este modelo representa la contrapartida del CeA. El flujo de información sugerido puede observarse en la Figura 19.



## 10.2 Conclusiones

- El modelo utilizado fue adecuado para inducir respuestas de miedo condicionado y no condicionado, como se demostró por el aumento de las conductas de evitación y evaluación del riesgo al exponer a las ratas a su depredador o a un contexto asociado a éste.
- La expresión de EGR-1 aumenta en el núcleo lateral, basal y la isla intercalada principal de la amígdala al exponer a una rata a un contexto asociado a un gato (miedo condicionado).
- No se observan cambios en la expresión de EGR-1 en el núcleo lateral, basal, central, medial y la isla intercalada principal de la amígdala al exponer a la rata de manera aguda a su depredador (miedo no condicionado), lo que indica que la expresión de EGR-1 es diferente entre el miedo condicionado y el miedo no condicionado.
- Lo anterior, en conjunto con el hecho de que el núcleo central no participa en el procesamiento de la información asociada al miedo a depredador, sugiere que existen diferentes circuitos para procesar cada tipo de miedo y que el circuito utilizado en el miedo condicionado a depredador hace uso de distintos circuitos cerebrales que los modelos de condicionamiento tradicionales.
- Se encontró un aumento de EGR-1 en la isla intercalada principal de la amígdala tras el miedo condicionado, lo que no había sido evaluado hasta ahora y conviene estudiar con más detalle.

## Bibliografía

- Abel, T. & Lattal, K.M., 2001. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current opinion in neurobiology*, 11(2), pp.180–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11301237>.
- Adamec, R. et al., 2012. A comparison of activation patterns of cells in selected prefrontal cortical and amygdala areas of rats which are more or less anxious in response to predator exposure or submersion stress. *Physiology & behavior*, 105(3), pp.628–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21971366> [Accessed January 16, 2014].
- Adamec, R.E. & Shallow, T., 1993. Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiology & behavior*, 54(1), pp.101–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8327588>.
- Alberini, C.M., 2009. Transcription Factors in Long-Term Memory and Synaptic Plasticity. *Physiological reviews*, 89(1), pp.1–46.
- American Psychiatric Association, 2002. *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales DSM-IV-TR*, Masson.
- Antoine, B., Serge, L. & Jocelyne, C., 2013. Comparative dynamics of MAPK/ERK signalling components and immediate early genes in the hippocampus and amygdala following contextual fear conditioning and retrieval. *Brain structure & function*, 219(1), pp.415–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23389809> [Accessed January 16, 2014].
- Asok, A. et al., 2013. Immediate early gene and neuropeptide expression following exposure to the predator odor 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT). *Behavioural brain research*, 248, pp.85–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23583519> [Accessed January 16, 2014].
- Bailey, C.H., Bartsch, D. & Kandel, E.R., 1996. Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), pp.13445–52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=33629&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Blanchard, D.C., Canteras, N.S., et al., 2005. Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 29(8), pp.1243–1253. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16084591> [Accessed January 14, 2014].
- Blanchard, D.C., Blanchard, R.J. & Griebel, G., 2005. Defensive Responses to Predator Threat. *Current Protocols in Neuroscience*, 8(19), pp.1–20.

- Blanchard, R.J. et al., 2001. Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 25(7-8), pp.587–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801284>.
- Blanchard, R.J. & Blanchard, D.C., 1989. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *Journal of comparative psychology (Washington, D.C. : 1983)*, 103(1), pp.70–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2924531>.
- Blanchard, R.J. & Blanchard, D.C., 1989. Attack and Defense in Rodents as Ethoexperimental Models for The Study of Emotion. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 13, pp.s3–s14.
- Burn, C.C., 2008. What is it like to be a rat? Rat sensory perception and its implications for experimental design and rat welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, 112(1-2), pp.1–32. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168159108000646> [Accessed May 28, 2014].
- Davis, M., 1992. THE ROLE OF THE AMYGDALA IN FEAR AND ANXIETY. *Annual Review of Neuroscience*, 15, pp.353–375.
- Davis, M. & Whalen, P.J., 2001. The amygdala: vigilance and emotion. *Molecular Psychiatry*, 6, pp.13-34.
- Dielenberg, R. a, Carrive, P. & McGregor, I.S., 2001. The cardiovascular and behavioral response to cat odor in rats: unconditioned and conditioned effects. *Brain research*, 897(1-2), pp.228–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11282383>.
- Dielenberg, R.A., Hunt, G.E. & McGregor, I.S., 2001. `WHEN A RAT SMELLS A CAT ': THE DISTRIBUTION OF FOS IMMUNOREACTIVITY IN RAT BRAIN FOLLOWING EXPOSURE TO A PREDATORY ODOR. *Neuroscience*, 104(4), pp.1085–1097.
- Ehrlich, I. et al., 2009. Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron*, 62(6), pp.757–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19555645> [Accessed January 10, 2014].
- Farach, F.J. et al., 2012. Pharmacological treatment of anxiety disorders: current treatments and future directions. *Journal of anxiety disorders*, 26(8), pp.833–43. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3539724&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed January 16, 2014].
- Van Groen, T. & Wyss, J., 1990. Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *Journal of Comparative Neurology*, 302(3), pp.515–28.

- Hall, J., Thomas, K.L. & Everitt, B.J., 2001. Cellular Imaging of zif268 Expression in the Hippocampus and Amygdala during Contextual and Cued Fear Memory Retrieval : Selective Activation of Hippocampal CA1 Neurons during the Recall of Contextual Memories. *The Journal of Neuroscience*, 21(6), pp.2186–2193.
- Howard, C.. & Reed, M.G., 1998. *Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy*. First Edit. Bios Scientific Publishers, ed., USA: Springer.
- Kaczmarek, L. & Chaudhuri, a, 1997. Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain research. Brain research reviews*, 23(3), pp.237–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9164673>.
- Knapska, E. & Kaczmarek, L., 2004. A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK? *Progress in neurobiology*, 74(4), pp.183–211. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15556287> [Accessed January 10, 2014].
- Ledoux, J.E., 2000. Emotion circuits in the Brain. *Annual Review of Neuroscience*, 23, pp.155–184.
- Li, C.-I., Maglinao, T.L. & Takahashi, L.K., 2004. Medial amygdala modulation of predator odor-induced unconditioned fear in the rat. *Behavioral neuroscience*, 118(2), pp.324–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15113258> [Accessed January 16, 2014].
- Luiten, P.G. et al., 1985. The cortico-medial amygdala in the central nervous system organization of agonistic behavior. *Brain research*, 332(2), pp.283–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4039616>.
- Maddox, S. a, Monsey, M.S. & Schafe, G.E., 2011. Early growth response gene 1 (Egr-1) is required for new and reactivated fear memories in the lateral amygdala. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 18(1), pp.24–38. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3023969&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed January 9, 2014].
- Malkani, S. & Rosen, J.B., 2000a. Differential expression of EGR-1 mRNA in the amygdala following diazepam in contextual fear conditioning. *Brain research*, 860(1-2), pp.53–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10727623>.
- Malkani, S. & Rosen, J.B., 2000b. Specific induction of early growth response gene 1 in the lateral nucleus of the amygdala following contextual fear conditioning in rats. *Neuroscience*, 97(4), pp.693–702. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10842014>.

- Martinez, R.C. et al., 2011. Amygdalar roles during exposure to a live predator and to a predator-associated context. *Neuroscience*, 172, pp.314–328. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20955766> [Accessed January 16, 2014].
- McDonald, a J., 1998. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress in neurobiology*, 55(3), pp.257–332. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9643556>.
- Medina-Mora, M.E. et al., 2007. Psychiatric disorders in Mexico: lifetime prevalence in a nationally representative sample. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*, 190, pp.521–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17541113> [Accessed January 17, 2014].
- Miyamoto, E., 2006. Review Molecular Mechanism of Neuronal Plasticity : Induction and Maintenance of Long-Term Potentiation in the Hippocampus. , 442, pp.433–442.
- Morrow, B. a et al., 2000. The predator odor, TMT, displays a unique, stress-like pattern of dopaminergic and endocrinological activation in the rat. *Brain research*, 864(1), pp.146–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10793199>.
- Müller, M. & Fendt, M., 2006. Temporary inactivation of the medial and basolateral amygdala differentially affects TMT-induced fear behavior in rats. *Behavioural brain research*, 167(1), pp.57–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16213603> [Accessed January 16, 2014].
- De Olmos, J.S. & Heimer, L., 1999. The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877, pp.1–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415640>.
- Orsini, C. a & Maren, S., 2012. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 36(7), pp.1773–802. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3345303&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed January 13, 2014].
- Palomares-Castillo, E. et al., 2012. The intercalated paracapsular islands as a module for integration of signals regulating anxiety in the amygdala. *Brain research*, 1476, pp.211–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22516107> [Accessed January 13, 2014].
- Pape, H. & Pare, D., 2010. Plastic Synaptic Networks of the Amygdala for the Acquisition , Expression , and Extinction of Conditioned Fear. *Physiological reviews*, 90, pp.419–463.

- Pare, D. & Duvarci, S., 2012. Amygdala microcircuits mediating fear expression and extinction. *Current opinion in neurobiology*, 22(4), pp.717–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3380167&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed January 10, 2014].
- Pentkowski, N.S. et al., 2006. Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *The European journal of neuroscience*, 23(8), pp.2185–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16630065> [Accessed June 2, 2014].
- Pérez de la Mora, M. et al., 2007. La amígdala, una estructura anatómica con relevancia para la ansiedad. In *Investigación en neurociencias. Homenaje al Dr. Alfredo Feria Velasco*. Bios-Médica.
- Pérez de la Mora, M. et al., 2010. Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Progress in neurobiology*, 90(2), pp.198–216. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19853006> [Accessed January 21, 2014].
- Ribeiro, a M. et al., 2011. Basolateral amygdala inactivation impairs learned (but not innate) fear response in rats. *Neurobiology of learning and memory*, 95(4), pp.433–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21315824> [Accessed April 3, 2014].
- Rosen, J.B. et al., 1998. Immediate-early gene expression in the amygdala following footshock stress and contextual fear conditioning. *Brain research*, 796(1-2), pp.132–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9689463>.
- Rosen, J.B., 2004. The neurobiology of conditioned and unconditioned fear: a neurobehavioral system analysis of the amygdala. *Behavioral and cognitive neuroscience reviews*, 3(1), pp.23–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15191640> [Accessed March 29, 2014].
- Rosen, J.B., Adamec, R.E. & Thompson, B.L., 2005. Expression of egr-1 (zif268) mRNA in select fear-related brain regions following exposure to a predator. *Behavioural brain research*, 162(2), pp.279–88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15970222> [Accessed January 16, 2014].
- Royer, S. & Paré, D., 2002. Bidirectional synaptic plasticity in intercalated amygdala neurons and the extinction of conditioned fear responses. *Neuroscience*, 115(2), pp.455–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12421611>.
- Sah, P. et al., 2003. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiological reviews*, 83(3), pp.803–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12843409>.

- Samson, R.D. & Paré, D., 2005. Activity-dependent synaptic plasticity in the central nucleus of the amygdala. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(7), pp.1847–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15716421> [Accessed June 2, 2014].
- Selden, N.R. et al., 1991. Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. *Neuroscience*, 42(2), pp.335–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1832750>.
- Shiple, M.T. & Adamek, G.D., 1984. The connections of the mouse olfactory bulb: a study using orthograde and retrograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Brain research bulletin*, 12(6), pp.669–88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6206930>.
- Sotres-Bayon, F. & Quirk, G.J., 2010. Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Current opinion in neurobiology*, 20(2), pp.231–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2878722&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed February 5, 2014].
- Swanson, L.W. & Petrovich, G.D., 1998. What is the amygdala ? *Trends in Neurosciences*, 21(8), pp.323–331.
- Szel, A. & Rohlich, P., 1992. Two Cone Types of Rat Retina Detected by Anti-visual Pigment Antibodies. *Experimental Eye Research*, 55, pp.47–52.
- Takahashi, L.K., 2014. Olfactory systems and neural circuits that modulate predator odor fear. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8(March), pp.1–13. Available at: [http://www.frontiersin.org/Behavioral\\_Neuroscience/10.3389/fnbeh.2014.00072/abstract](http://www.frontiersin.org/Behavioral_Neuroscience/10.3389/fnbeh.2014.00072/abstract) [Accessed March 21, 2014].
- Takahashi, L.K. et al., 2007. Predator odor-induced conditioned fear involves the basolateral and medial amygdala. *Behavioral neuroscience*, 121(1), pp.100–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17324054> [Accessed January 16, 2014].
- Takahashi, L.K. et al., 2005. The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 29(8), pp.1157–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16095694> [Accessed April 30, 2014].
- Viviani, D. & Stoop, R., 2008. Opposite effects of oxytocin and vasopressin on the emotional expression of the fear response. *Progress in brain research*, 170, pp.207–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18655884> [Accessed May 4, 2014].

- Walker, D.L., Toufexis, D.J. & Davis, M., 2003. Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *European Journal of Pharmacology*, 463(1-3), pp.199–216. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299903012822> [Accessed January 16, 2014].
- Wallace, K.J. & Rosen, J.B., 2001. Neurotoxic Lesions of the Lateral Nucleus of the Amygdala Decrease Conditioned Fear But Not Unconditioned Fear of a Predator Odor : Comparison with Electrolytic Lesions. *The Journal of Neuroscience*, 21(10), pp.3619–3627.
- Zangrossi, H. & File, S.E., 1992. Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. *Brain research bulletin*, 29(3-4), pp.381–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1393611>.