



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EL AUMENTO DE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL POR
ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL PREVIENE EL REGRESO
DEL MIEDO CONDICIONADO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MAGDA ABRIL GAONA GAMBOA



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. FRANCISCO XAVIER SOTRES BAYÓN
2017**

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradezco al jurado que pacientemente revisó y criticó tan constructivamente este trabajo.

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez.

Dra. Angélica Zepeda Rivera.

Dr. Julio Morán Andrade.

M. en C. Julio Alejandro Prieto Sagredo.

Agradecimientos

Deseo agradecer en esta tesis, primeramente, a los animales de laboratorio, cuyas vidas permiten que la investigación avance y son los nobles modelos de los experimentos con los que pretendemos entender a la Naturaleza.

En segundo lugar, a mis padres, que con su apoyo y amor incondicionales me han permitido lograr cualquier cosa que he conseguido digna de mención.

Agradezco infinitamente al Dr. Alonso Martínez Canabal, quién me enseñó las maravillas que son el cerebro y la neurogénesis, que compartió conmigo su vasto conocimiento sobre ciencia y arte, porque ha sido más que un maestro, un amigo.

Agradezco profundamente al Dr. Francisco Sotres Bayón, por todo el conocimiento compartido. Por permitirme estar en su laboratorio y darme los elementos para responder a mis preguntas. Gracias jefe por tenerme tanta paciencia.

Y finalmente, pero no menos importante, a Laura Fernanda Figueroa Rodríguez, sin ella a mi lado durante tantos años, mi vida no habría sido la misma. Eres más que la hermana que nunca tuve.

Agradecimientos especiales

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Francisco Sotres Bayón y con el invaluable apoyo técnico de la Dra. Leticia Ramírez Lugo del laboratorio AL 303 de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

La presente tesis constituye parte del proyecto de investigación apoyado por el donativo No. 176639 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como los donativos No. IA200313, IA200715 y IN205417 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM y por el programa “IBRO Return Home Fellowship”.

Contenido

Agradecimientos	iii
Agradecimientos especiales	iv
Lista de Abreviaturas	viii
Lista de Figuras	viii
Resumen.....	xi
Introducción	1
El miedo.	1
Condicionamiento clásico.	1
Condicionamiento al miedo.....	2
Tipos de condicionamiento al miedo	3
Estructuras que integran el circuito del condicionamiento de miedo contextual	5
La Neurogénesis Hipocampal: ¿Qué es y desde cuándo se conoce?	9
Origen de las células precursoras	12
Cronología anatómica de una nueva neurona del giro dentado	13
Regulación de las nuevas neuronas	15
Circuito neural del condicionamiento de miedo contextual.....	18
Extinción.....	19
¿Qué es la extinción?	19
Estructuras que integran el circuito de la extinción	20
Circuito neural de la extinción	21
Control de la expresión del miedo.	22
El regreso del miedo	25
Las 3 r (renovación, reinstalación y recuperación espontánea).	25
Una herramienta para evitar el regreso del miedo.....	27
Justificación, Objetivos e Hipótesis	29
Justificación	29
Objetivos	31
Objetivo general.....	31
Objetivos particulares	31
Hipótesis	32
Material y Método	33
Sujetos	33

Equipo conductual.....	33
Moldeamiento y Entrenamiento.....	35
Condicionamiento.....	39
Extinción.....	40
Prueba 1.....	40
Prueba 2.....	40
Separación de grupos.....	41
Experimentos	42
Inmunohistoquímica	44
Microfotografías y procesamiento de las imágenes.....	48
Procesamiento de los datos obtenidos	49
Conteo y análisis de cFos.	49
Gelatinización de las laminillas	50
Resultados.....	51
El enriquecimiento ambiental aumenta la neurogénesis hipocampal y proporcionado tras la extinción evita el regreso del miedo.....	51
El enriquecimiento ambiental promueve el aumento en la neurogénesis	55
La neurogénesis hipocampal promovida por el enriquecimiento ambiental correlaciona positivamente con la disminución de las respuestas de miedo.	55
Activación diferencial en hipocampo, corteza prefrontal y habénula.	57
El aumento de neurogénesis antes de la extinción no tiene efecto alguno sobre el regreso del miedo.....	59
El aumento de la neurogénesis antes de la extinción no tiene correlación con la expresión de conductas asociadas con miedo.....	61
En ausencia de extinción, el aumento de neurogénesis no tiene correlación con la expresión de conductas asociadas con miedo.....	63
.....	64
Sin extinción del miedo no hay recuperación espontánea ni efecto del enriquecimiento ambiental.	64
El efecto neurogénico del enriquecimiento ambiental es específico del GD.	65
El aumento de neurogénesis en ausencia de extinción no tiene correlación con la expresión de conductas asociadas con miedo.....	67
Discusión	69
El enriquecimiento ambiental aumenta la neurogénesis hipocampal y proporcionado tras la extinción evita el regreso del miedo.....	70

El aumento en la neurogénesis se relaciona con la disminución de miedo.....	71
Activación diferencial en hipocampo, corteza prefrontal y habénula.	73
El aumento de neurogénesis antes de la extinción no tiene efecto alguno sobre el regreso del miedo.....	75
El enriquecimiento ambiental antes de la extinción no evita que el miedo regrese	76
El aumento de la neurogénesis antes de la extinción no tiene correlación con la expresión de conductas asociadas con miedo.	77
El aumento de la neurogénesis en ausencia de la extinción no tiene correlación con la expresión de conductas asociadas con miedo.	78
La ablación de la neurogénesis combinada con el enriquecimiento ambiental tras la extinción no previene el regreso del miedo.....	80
Perspectivas futuras.....	82
Conclusión	83
Referencias Bibliográficas.....	84

Lista de Abreviaturas

EA enriquecimiento ambiental

EC Estímulo condicionado

EI Estímulo incondicionado

RI Respuesta incondicionada

RC Respuesta condicionada

CPFm Corteza Prefrontal medial

LA Amígdala lateral

PL Corteza Prelímbica

IL Corteza Infralímbica

COF Corteza Orbitofrontal

CPF Corteza Prefrontal

HbL Habénula lateral

BA Amígdala Basal

CeA Amígdala central

BLA Amígdala basolateral

MCIT Masa de células intercaladas

CA Cornu ammonis

CA1 Cornu ammonis 1

CA2 Cornu ammonis 2

CA3 Cornu ammonis 3

GD Giro dentado

BrdU Bromodesoxiuridina

DCX Doblecortina

MAM Acetato de metilazoximetanol

VTA Área ventral tegmental

GPA Sustancia gris periacueductal

Lista de Figuras

Figura 1. Tipos de condicionamiento al

Figura 2. Conectividad en el hipocampo.

Figura 3. Tipos celulares a los que puede dar origen una célula troncal multipotente.

Figura 4. Cronología de una nueva neurona

Figura 5. Circuito del condicionamiento de miedo al contexto.

Figura 6. Circuito de la inhibición del miedo.

Figura 7. Esquema de la regulación

Figura 8. Caja de madera aislante.

Figuras 8 y 8.1. Caja de condicionamiento operante, particularidades. Caja de plexiglás transparente.

Figuras 8.3 y 8.4. Caja de condicionamiento operante, particularidades. Charola colectora y rejilla electrificada.

Figuras 8.5 y 8.6. Caja de condicionamiento operante, particularidades.

Dispensador de pellets y palanca (mecanismo)

Figura 9. Vista exterior de la caja de moldeamiento.

Figura 9.1. Vista interior de la caja de moldeamiento.

Figura 10. Vista exterior de la caja de condicionamiento.

Figura 10.1 Acercamiento al interior de la caja.

Figura 11. Grupo control.

Figura 12. Grupo con enriquecimiento ambiental.

Figura 13. Diseño experimental: PostExt.

Figura 14. Diseño experimental PreExt.

Figura 15. Diseño experimental NoExt.

Figura 16. El enriquecimiento ambiental tras la extinción evita la recuperación espontánea del miedo.

Figura 17. El grupo enriquecido no presenta recuperación espontánea del miedo contextual en comparación con el grupo control.

Figura 18. El grupo Enriquecido presenta más DCX que el Control y ésta DCX se relaciona con la conducta.

Figura 18.1 El grupo Enriquecido presenta más DCX que el Control

Figura 19. Grafica del Z-Score de las estructuras teñidas y contadas en este trabajo.

Figura 19.1. Conteo de c-Fos por área. Solamente CA3 dorsal, PL y HbL exhibieron una activación diferencial significativa entre grupos.

Figura 20. El enriquecimiento ambiental previo a la extinción no tiene efecto en la recuperación espontánea del miedo.

Figura 21. El grupo enriquecido presenta más DCX que el control y esta DCX se relaciona negativamente con el congelamiento y positivamente con el palanqueo.

Figura 21.1 El grupo enriquecido presenta más DCX que el control.

Figura 22. El enriquecimiento ambiental en ausencia de extinción no tiene efecto en la recuperación espontánea del miedo.

Figura 23. Sin extinción el miedo no hay recuperación espontánea ni efecto del enriquecimiento ambiental.

Figura 24. Los animales enriquecidos tienen más neurogénesis que los controles y éste efecto es específico del GD.

Figura 24. 1 Los animales enriquecidos tienen más neurogénesis que los controles y este efecto es específico de GD.

Figura 25. La neurogénesis no se relaciona con la conducta, en ausencia de extinción.

Figura 26. Relaciones de actividad entre las estructuras que pueden conformar el circuito del no regreso del miedo.

Figura 27. La ablación de la neurogénesis a pesar del enriquecimiento ambiental, no evita el regreso del miedo.

Resumen

Una experiencia aversiva ocurrida en un lugar determinado, origina la formación de una memoria de miedo asociada al contexto donde ocurrió dicho evento. Si este mismo lugar deja de ser peligroso, las respuestas de miedo se debilitarán gradualmente, a este proceso se le conoce como extinción. La extinción forma una nueva memoria asociada con este contexto. La memoria de extinción es menos persistente que la memoria de miedo, lo que promueve que la memoria de miedo se exprese nuevamente tras el paso del tiempo. Las memorias de miedo y de extinción asociadas a un contexto son dependientes del hipocampo. El hipocampo tiene como particularidad, la generación de nuevas neuronas (neurogénesis) en la etapa adulta. Se ha propuesto que estas nuevas neuronas pueden modificar la expresión de memorias dependientes de hipocampo preexistentes. Sin embargo, se desconoce si las nuevas neuronas contribuyen en la modulación del regreso de la memoria de miedo.

Para responder esta pregunta, hipotetizamos que el aumento de la neurogénesis hipocampal tras la extinción, podría evitar el regreso del miedo, favoreciendo la actividad relacionada con los circuitos de la memoria de extinción por sobre los del miedo. Para probar tal hipótesis, se incrementó la neurogénesis antes, después y en ausencia de extinción, mediante un mes de exposición a enriquecimiento ambiental (EA). Encontramos que, las ratas cuya neurogénesis fue exacerbada después, pero no antes ni en ausencia de la extinción, mostraron una recuperación baja del miedo. Para comprobar que el EA tuvo un efecto en el

incremento de la neurogénesis, se realizó inmunohistoquímica para localizar la proteína doble cortina (DCX), usada como marcador de neuronas inmaduras. Para saber qué regiones se activaron durante la recuperación del miedo, usando la misma técnica, se localizó la proteína c-Fos, usada como marcador de actividad neuronal reciente, en regiones relacionadas con la regulación del miedo contextual (el hipocampo, la habénula, las cortezas prefrontales y la amígdala). Encontramos que el aumento de la neurogénesis hipocampal promovido por enriquecimiento ambiental, puede evitar la recuperación espontánea del miedo condicionado a un contexto. Este efecto sucede únicamente si el enriquecimiento ambiental y por lo tanto el aumento de la neurogénesis sucede después del aprendizaje de extinción. Además, encontramos que los animales con neurogénesis hipocampal aumentada por EA, tenían una mayor cantidad de células c-Fos+ en la región CA3 dorsal del hipocampo y menos en la corteza prefrontal prelímbica y la Habénula, lo que puede relacionarse con la actividad en estas regiones.

Esto indica que el mecanismo mediante el cual la neurogénesis hipocampal mediada por EA evita la recuperación espontánea podría estar recurriendo a una modificación en la actividad en las regiones CA3, corteza prelímbica y habénula.

Como conclusión, se observó que la influencia de la neurogénesis sobre la recuperación del miedo es dependiente de la extinción. Por primera vez se ha mostrado que las nuevas neuronas pueden ser reguladores de circuitos relacionados con la extinción del miedo. Esto podría brindar un nuevo panorama en los tratamientos de extinción usados para tratar desórdenes de miedo.

Introducción

El miedo.

De manera cotidiana los animales deben hacer frente a situaciones que ponen en peligro su vida, cuando esto sucede se forma una memoria de miedo relacionada con el contexto donde sucedió el evento aversivo y el miedo se expresa. El miedo es un conjunto de respuestas fisiológicas y conductuales que protegen a los organismos durante situaciones donde la supervivencia es puesta en riesgo (Darwin 1872). Algunos ejemplos de estas respuestas son, el congelamiento o inmovilización y el aumento del ritmo cardíaco. Este conjunto de respuestas, se ha conservado evolutivamente y existe tanto en roedores como en humanos (LeDoux 2000). En condiciones de laboratorio, el modelo mediante el cual se estudia el miedo es una modificación del condicionamiento clásico de Pavlov, denominado condicionamiento de miedo (Davis 1992, LeDoux 2000).

Condicionamiento clásico.

En el condicionamiento clásico, Pavlov hacía sonar una campana e inmediatamente después proporcionaba a sus perros polvo de carne. Tras repetir esto algunas veces, los perros salivaban simplemente con oír la campana a pesar de no haber recibido polvo de carne. Entonces, en el condicionamiento clásico un estímulo inicialmente neutro (p. ej. una campana) denominado estímulo condicionado (EC), adquiere un significado de valor emocional cuando se asocia durante repetidas ocasiones con un evento de importancia biológica (p. ej. la alimentación) llamado estímulo incondicionado (EI) (Pavlov 1927).

Debido a su naturaleza, el EI genera por sí mismo una respuesta en el organismo, en este caso la salivación, a la que se le denomina respuesta incondicionada (RI). Cuando la asociación entre el EC y el EI se establece, la mera exposición al EC es suficiente para generar esta respuesta (p. ej. la salivación) que ahora se denomina respuesta condicionada (RC) (Pavlov 1927).

Condicionamiento al miedo.

Como se mencionó previamente, el paradigma conductual mediante el cual se estudia el miedo en el laboratorio es una modificación del condicionamiento clásico. Mediante el mismo mecanismo, Pavlov descubrió que al asociar un estímulo neutro (p. ej. una campana) con un estímulo aversivo (p. ej. un poco de ácido en la boca) se generaban respuestas condicionadas de rechazo (Pavlov 1927). Algunos ejemplos de estas respuestas incluyen conductas como inmovilización o congelamiento, respuestas autonómicas (p. ej. alteración del ritmo cardíaco, presión sanguínea) y respuestas endocrinas (p. ej. liberación de hormonas). De hecho, la respuesta de inmovilización es uno de los parámetros más usados para cuantificar el miedo en estudios de condicionamiento de miedo en roedores. Y es uno de los parámetros que se usaron en este trabajo para cuantificar el miedo (Revisar el apartado de inmovilización en métodos).

El fundamento del condicionamiento de miedo es que, el estímulo incondicionado que es inicialmente aversivo, se asocia con un estímulo condicionado neutro. De tal modo que la simple presentación del estímulo condicionado generará respuestas de miedo, de hecho, este es el mecanismo por el cual aprendemos a temer a la gente, objetos, lugares y animales (Fanselow

1994). Existen dos tipos básicos de condicionamiento de miedo, según la naturaleza del estímulo incondicionado que participa en ellos.

Tipos de condicionamiento al miedo

Dentro de los tipos de condicionamiento de miedo, los más comúnmente utilizados son el de condicionamiento de miedo a un estímulo auditivo (p. ej. un tono) y el condicionamiento de miedo a un contexto (p. ej. una caja). En el condicionamiento de miedo al tono, se asocia un tono (EC) con un choque eléctrico (EI), de modo que cuando se les presenta el tono a los animales en cualquier lugar, se evocan las respuestas de miedo. Mientras que, en el condicionamiento contextual, el choque eléctrico (EI) se asocia con el contexto (EC). Entonces, cuando los animales regresan al contexto del condicionamiento, se evocan las respuestas de miedo, siendo una de ellas la inmovilización (Rudy, Huff et al. 2004).

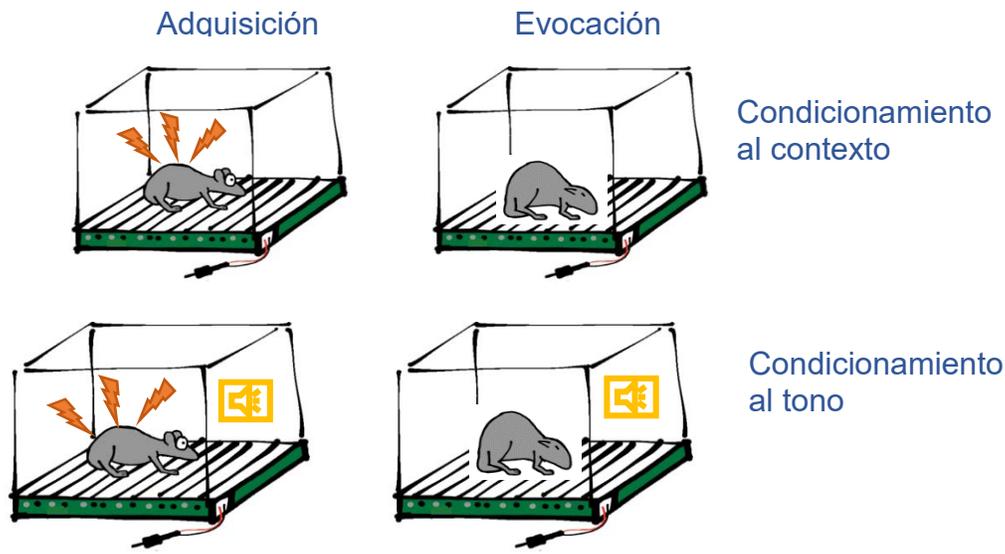


Figura 1. Tipos de condicionamiento al miedo. Esquemas de arriba. Condicionamiento contextual. El contexto se asocia a un evento aversivo (por ejemplo, un choque eléctrico) de tal modo que después cuando el animal se exponga únicamente al contexto evocará las respuestas de miedo. **Esquemas de abajo:** Condicionamiento al tono. Los animales aprenden que un tono predice la ocurrencia de un evento aversivo y después la simple presentación del tono será suficiente para evocar las respuestas de miedo. Imagen modificada de www.mazeengineers.com

Sin importar el tipo de condicionamiento al miedo, la información de la asociación de los EC-EI llega a la amígdala, que se encarga de promover las respuestas de miedo (Fanselow 1994). La ruta por la que los estímulos se transmiten y codifican varía según el tipo de condicionamiento al miedo del que se trate. En el condicionamiento contextual, la información que el circuito que transmite e integra la información de la asociación entre el EC y el EI involucra a la amígdala, al hipocampo y la corteza prefrontal medial (CPFm). A continuación, se aborda la anatomía y conectividad que integran el circuito subyacente a la memoria de miedo.

Estructuras que integran el circuito del condicionamiento de miedo contextual

Amígdala

La amígdala es una estructura fundamental en la memoria y aprendizaje con contenido emocional. La amígdala es necesaria para la adquisición, consolidación y expresión del miedo al contexto y al tono (Phelps and LeDoux 2005). A nivel celular se ha probado que la amígdala puede establecer importantes engramas de soporte a las memorias de miedo y además, su posición de importancia dentro de la regulación del miedo se da por su conectividad con áreas clave como la corteza prefrontal, el hipocampo, la sustancia gris periacueductural y el hipotálamo.

Básicamente se puede subdividir a la amígdala en dos sistemas o conjuntos importantes para ambos tipos de condicionamiento de miedo (LeDoux 1995, Maren and Fanselow 1996). El primer subsistema comprende a la amígdala lateral (LA) y a la amígdala basal (BA) que forman el complejo basolateral (BLA). Este complejo es la primera interfaz sensorial en la amígdala, a él llega la información de las áreas talámicas auditivas si el EI es un tono, o del hipocampo si el EI es el contexto (LeDoux 2000). El segundo subsistema consiste en la amígdala central (Ce), que constituye la interfaz de salida para las respuestas de miedo (Maren 2001). La Ce está localizada en la parte medial de la amígdala, delimitado lateralmente por el BLA (Schiess, Callahan et al. 1999).

Anatómicamente en el BLA predominan dos tipos de neuronas. El primer tipo, al que pertenece la mayoría de la población, son llamadas neuronas piramidales.

Representan aproximadamente al 70% del total de neuronas y su actividad es excitatoria glutamatérgica (Millhouse and DeOlmos 1983). Estas neuronas tienen soma de forma triangular con una dendrita notablemente prominente llamada dendrita apical y un grupo de dendritas que salen directamente de la parte basal del soma llamadas dendritas basales (Faber, Callister et al. 2001) . El otro tipo de neuronas son neuronas inhibitorias. Este grupo de neuronas inhibitorias llamado masa de células intercaladas (MCIT) es un grupo de células GABAérgicas que rodean a la BLA (Millhouse 1986). Se piensa que este grupo de células modulan las interacciones entre la BLA y la Ce. Además, se sabe que las relaciones inhibitorias son muy importantes para la plasticidad de la amígdala (Ehrlich, Humeau et al. 2009). De hecho, la MCIT juega un rol importante en la inhibición de las respuestas de miedo.

Corteza Prefrontal medial

Tanto en humanos como en roedores se ha encontrado que la corteza prefrontal medial (CPFm) tiene un rol importante en muchas conductas complejas, como la expresión y la extinción del miedo condicionado (Sotres-Bayon and Quirk 2010). Se ha observado que las diversas partes de la CPFm tienen diferentes funciones en el condicionamiento de miedo. La corteza infralímbica (IL) es importante en la inhibición de las respuestas de miedo tras la extinción, mientras que la corteza prelímbica (cPL) es importante en la generación y control de respuestas de miedo (Sotres-Bayon and Quirk 2010).

La cPL es un área determinante en la conducta de miedo (Sierra-Mercado, Padilla-Coreano et al. 2011). Lo anterior ha sido evidenciado al inactivarla y

observar una reducción de las respuestas de miedo en ambos tipos de condicionamiento (Corcoran and Quirk 2007, Laurent and Westbrook 2009). Otra evidencia de la participación de la cPL se obtuvo mediante el uso de registros electrofisiológicos. Se observó que las neuronas en la cPL expresan actividad eléctrica sostenida e incluso en aumento durante el tiempo de expresión de respuestas de miedo a un tono (Burgos-Robles, Vidal-Gonzalez et al. 2009). De hecho, se sugiere que las respuestas de miedo inician en la BLA, pero son sostenidas por la cPL (Sotres-Bayon, Sierra-Mercado et al. 2012).

Respecto a su disposición anatómica, la cPL yace dorsal a la IL, a pesar de ser estructuras bastante cercanas, pueden distinguirse con base en su organización citoarquitectónica y laminar (Giustino y Maren, 2015). Dada la complejidad de la información que procesa la CPFm se requiere la interacción entre diferentes tipos celulares de dos categorías básicas, células piramidales excitatorias (80-90%) e interneuronas inhibitorias (10-20%) (DeFelipe and Farinas 1992, Gabbott, Warner et al. 2005).

Hipocampo

El hipocampo es una de las estructuras fundamentales para la existencia de la memoria declarativa y espacial. El hipocampo participa en la realización de los mapas cognitivos del ambiente necesarios para la navegación espacial (Eichenbaum and Cohen 2014). Se ha observado que tras el condicionamiento de miedo las células del hipocampo cambian su patrón de disparo solamente cuando el animal está en el contexto donde se llevó a cabo el condicionamiento (Moita, Rosis et al. 2004). El hipocampo participa activamente en el aprendizaje y formación

de las memorias de condicionamiento contextual y extinción (Maren and Quirk 2004, Sotres-Bayon, Cain et al. 2006)

En cuanto a su anatomía básica, el hipocampo de los mamíferos está integrado por dos sectores en forma de U cuyas partes se denominan: Giro dentado (GD) y *cornu ammonis* (CA). El CA se divide en 3 áreas CA1, CA2 y CA3. Las principales células del hipocampo son, neuronas granulares glutamatérgicas del GD y las neuronas piramidales glutamatérgicas en las regiones CA1, CA2 y CA3 (Bannister and Larkman 1995, Hosseini-Sharifabad and Nyengaard 2007, Martinez Canabal 2013).

En cuanto al flujo de información en el hipocampo, la corteza entorrinal es la principal entrada de información, a través de la vía perforante. La vía perforante lleva conexiones hacia CA3 y hacia el GD. El GD contiene a la población de células excitatorias más grande de toda la estructura. CA3 y CA1 representan las principales salidas de información del hipocampo (Witter et al. , 1989). Las salidas

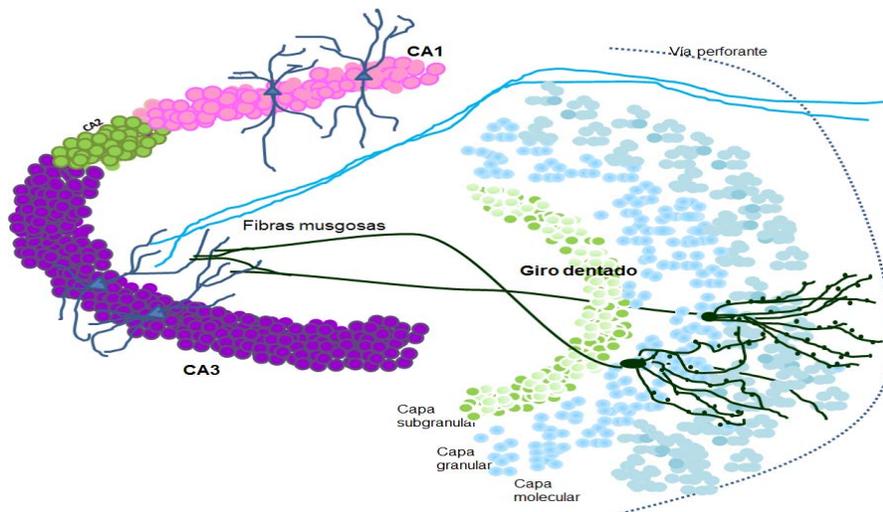


Figura 2. Conectividad en el Hipocampo. La vía perforante es la principal fuente de información externa proveniente de la Corteza Entorrinal, llega al GD y a CA3. El GD proyecta a CA3 a través de las fibras musgosas. CA3 proyecta hacia sí misma y hacia CA1 a través de las fibras colaterales de Schaffer.

principales de CA3 son las fibras colaterales de Schaffer (excitatorias) que llegan a células cercanas en CA3 y CA1, lo que permite la retroalimentación entre el GD y CA3 (Leranth and Hajszan 2007). Los axones de las células del GD que se extienden hacia CA3 forman las fibras musgosas, que se conectan con las células piramidales de CA3.

En la zona subgranular del GD se lleva cabo la producción de nuevas neuronas o neurogénesis. De hecho, solo hay evidencias de neurogénesis en dos áreas del cerebro, la zona subgranular del giro dentado y la zona subventricular de los ventrículos laterales del bulbo olfatorio. Estas nuevas neuronas al madurar, son totalmente capaces de integrarse a circuitos preexistentes. Por lo que se piensa que las nuevas neuronas generadas en el hipocampo adulto, podrían tener alguna importancia en la memoria de tareas dependientes de hipocampo, como la memoria de condicionamiento contextual al miedo.

La Neurogénesis Hipocampal: ¿Qué es y desde cuándo se conoce?

La neurogénesis hipocampal adulta es un proceso conservado evolutivamente y ha sido observado todos los vertebrados, en diferentes especies de peces aves y mamíferos (Gage 2000, Alvarez-Buylla, Seri et al. 2002, Nottebohm 2002). La neurogénesis se refiere a la proliferación neuronal tras el nacimiento. Durante la proliferación neuronal, las células progenitoras se dividen asimétricamente para dar origen a una nueva célula. Sin embargo, también abarca los procesos de determinación del linaje celular, su diferenciación, maduración, migración y su eventual integración a una red funcional.

Santiago Ramón y Cajal tras hacer diversas observaciones, llegó a la conclusión de que las neuronas únicamente son producidas durante el desarrollo embrionario, por lo que la neurogénesis después del nacimiento quedó descartada. La inmutabilidad del número neuronal en el sistema nervioso adulto permaneció como dogma central de las neurociencias durante medio siglo (Brown, Couillard-Despres et al. 2003). En la década de los 50's del siglo XX, una nueva técnica basada en el uso de [H^3] timidina tritiada permitió la observación de neurogénesis en cerebros de ratón por primera vez (Altman and Das 1965). En los años 70 se demostró que las neuronas nuevas nacidas en el hipocampo logran sobrevivir y establecer contactos sinápticos (Kaplan and Hinds 1977). Con estos hallazgos se rompió el dogma del número fijo de neuronas en el cerebro postnatal (Ramón y Cajal, 1913) y la neurogénesis se convirtió en un tema recurrente en la investigación.

Una evidencia muy importante de la existencia de la neurogénesis en el cerebro adulto de roedores, se logró gracias al avance en las técnicas moleculares. Como el uso de la bromodesoxiuridina (BrdU), un análogo sintético de la timidina, que se integra al DNA durante la fase S (síntesis) y permite marcar a las células. Estas pueden detectarse por inmunohistoquímica posteriormente (Ming and Song 2005). Con el advenimiento de marcadores celulares específicos se logró identificar con mayor claridad y certeza a las neuronas inmaduras, con lo que se inició el estudio de las características y función de las nuevas neuronas (Brown, Couillard-Despres et al. 2003). Por ejemplo, la expresión de la proteína de unión a microtúbulos, doblecortina (DCX) puede ser usada como un marcador adecuado de

neurogénesis (Brown, Couillard-Despres et al. 2003). Esta proteína está implicada en la migración de los neuroblastos y se expresa en altos niveles en el sistema nervioso central en desarrollo (des Portes, Pinard et al. 1998, Francis, Koulakoff et al. 1999). Aunque se sabe que la expresión de esta proteína disminuye mucho tras el nacimiento, su expresión persiste de forma prominente en las dos áreas neurogénicas del sistema nervioso central, el GD del hipocampo y la zona subventricular de los ventrículos laterales del bulbo olfatorio (Gage 2000, Alvarez-Buylla, Seri et al. 2002).

Un buen ejemplo de marcador útil en este estudio, es el gen de expresión temprana c-Fos, ya que la transcripción de c-Fos ocurre tras minutos de que la célula genere un potencial de acción, a los 30-45 minutos ocurre un pico en la expresión de RNAm (Muller, Bravo et al. 1984). Además, la expresión basal de c-Fos es muy baja en la mayoría de las neuronas, de modo que es un marcador confiable de actividad neuronal, además puede ser inducida por una amplia variedad de estímulos (Herdegen, Kovary et al. 1995).

Conforme se ha avanzado en las técnicas moleculares e histológicas, se ha logrado ahondar más en el origen y función de las nuevas neuronas hipocampales. Pero no fue hasta 1992 que se logró aislar a las células progenitoras neurales de un cerebro de roedor adulto (Reynolds and Weiss 1992). El origen de las células progenitoras que dan origen a nuevas células en el cerebro adulto fue un tema de debate intenso durante algunos años (Ming and Song 2005).

Origen de las células precursoras

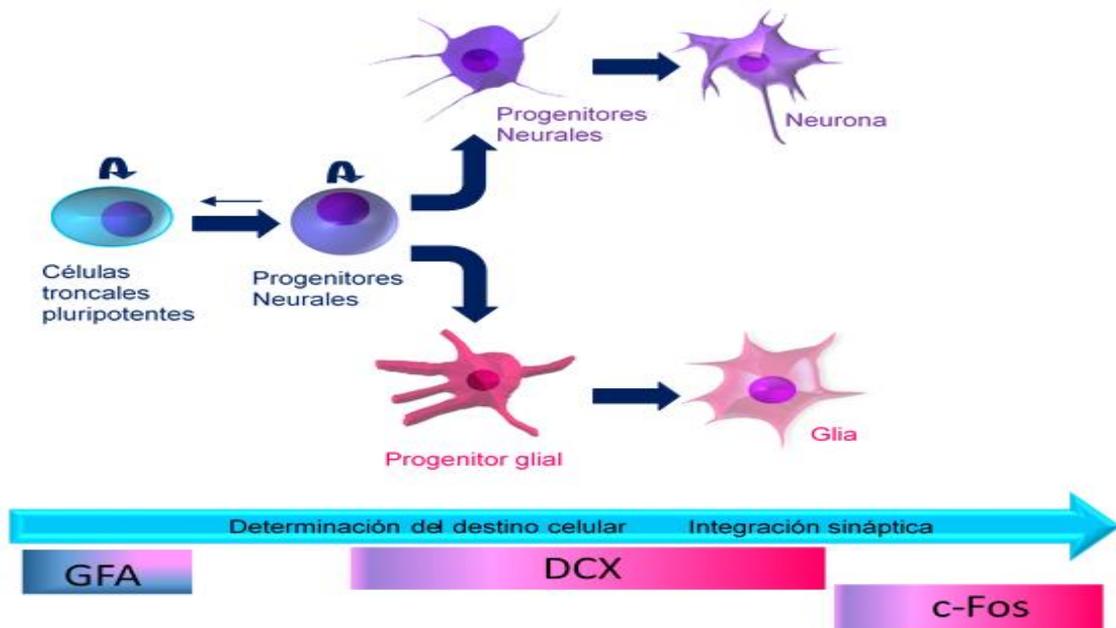


Figura 3. Tipos celulares a los que puede dar origen una célula troncal pluripotente y los marcadores histológicos que pueden ser usados según la etapa de madurez neuronal. (Modificado de Gage, 2000)

Se han propuesto varios tipos celulares como el posible origen de las células precursoras, uno de los más aceptados son los astrocitos (Doetsch, Caille et al. 1999). Se ha propuesto que este tipo celular puede identificarse por la expresión de Sox2, un factor de transcripción fundamental en el mantenimiento de las células pluripotentes (Zhao, Choi et al. 2007). Hay básicamente dos grupos de células en el sistema nervioso central con actividad mitótica, las células troncales neurales y las células progenitoras (Morshead, Reynolds et al. 1994). Las células troncales neurales se derivan de células troncales embrionarias (Duan, Kang et al. 2008). Las células troncales neurales son pluripotentes y pueden dar origen a otras células de linaje neural, entre ellas a las células progenitoras (Gage 2000).

Las células progenitoras neurales son las únicas que pueden dar origen a nuevas neuronas en el giro dentado (Duan, Kang et al. 2008). Estas células son capaces de dividirse asimétricamente y pueden dar origen a diferentes linajes celulares, como astrocitos y neuronas funcionales (Gage 2000).

Como producto de la neurogénesis hipocampal, cada mes se agregan aproximadamente 250 mil nuevas células al GD, lo que representa un 6% del total de células en el GD. No obstante, la mayoría de estas nuevas neuronas mueren (Young, Lawlor et al. 1999, Biebl, Cooper et al. 2000, Kempermann, Gast et al. 2003, Lagace, Whitman et al. 2007).

Cronología anatómica de una nueva neurona del giro dentado

Desde la división, hasta el momento en el que una nueva neurona logra integrarse a un circuito pasan entre 4 y 7 semanas (Zhao et al., 2006). Sin embargo, los axones pueden empezar a crecer desde los 10 -17 días tras la mitosis (Hastings and Gould 1999). Aunque su crecimiento continúa hasta el día 50 (Zhao, Teng et al. 2006). Unos pocos días después de la mitosis ocurre una baja notable en el número de células (Kempermann, Gast et al. 2003). No obstante, a las dos semanas y media es probable que las neuronas presentes sobrevivan (Kempermann, Gast et al. 2003). En esta etapa, las neuronas tienen un núcleo redondo o ligeramente triangular con una dendrita apical muy clara (Hastings and Gould 1999).

Una semana después de la división mitótica, las nuevas células se localizan en la capa granular interna, sus dendritas no han rebasado esta capa y aún no tienen espinas (Ambrogini, Lattanzi et al. 2004). Las espinas dendríticas comienzan a ser conspicuas en la segunda semana post mitosis, aproximadamente el día 16 (Zhao et al., 2006). Durante la tercera semana las nuevas neuronas empiezan a recibir aferencias excitatorias, y muestran bajos umbrales para presentar potenciales de acción. Aproximadamente después de un mes, las nuevas células

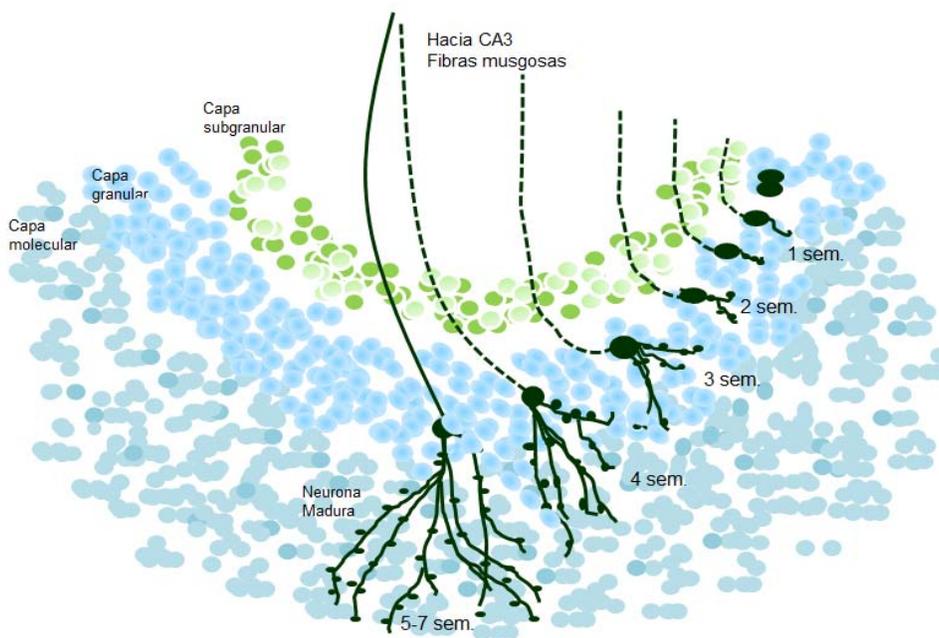


Figura 4. Cronología de una nueva neurona. Esquema del crecimiento cronológico de una neurona granular postnatal en el giro dentado del hipocampo.

ya están completamente maduras, sus árboles dendríticos ya están desarrollados y han alcanzado las partes más distales de la capa molecular del GD (Esposito, Piatti et al. 2005). Entre las semanas 4-7 las nuevas células son prácticamente indistinguibles de las otras neuronas granulares. Para este momento las células, ahora ya neuronas granulares maduras, deberán encontrar su lugar entre los circuitos y establecer conexiones (Kempermann, Jessberger et al. 2004).

Regulación de las nuevas neuronas

Las neuronas inmaduras tienen características estructurales y funcionales que las hacen especialmente diferentes de las neuronas maduras. Pero estas características persisten sólo por un corto período de tiempo tras su nacimiento (Deng, Aimone et al. 2010). Este período es crítico para la supervivencia de las neuronas. Se ha sugerido que la actividad que las neuronas inmaduras tengan y la red sináptica preexistente son fundamentales para el desarrollo plástico de las mismas y su supervivencia (Valjakka, Vartiainen et al. 1998).

Una de las características más notables de las neuronas inmaduras es su plasticidad exacerbada (Deng, Aimone et al. 2010). Debido a esto, se piensa que las nuevas neuronas influyen de algún modo en el desempeño de tareas dependientes de memoria hipocampal (Kee, Teixeira et al. 2007, Tashiro, Makino et al. 2007, Deng, Saxe et al. 2009). Existen evidencias de que el aprendizaje es uno de los moduladores positivos más importantes de la neurogénesis hipocampal (Gould, Beylin et al. 1999).

Vivir en un ambiente enriquecido brinda oportunidades constantes de exploración, juegos y aprendizaje (van Praag, Kempermann et al. 2000) por lo que se le considera como una forma no agresiva de aumentar la cantidad de nuevas neuronas en el GD. El enriquecimiento ambiental también promueve la supervivencia de las neuronas inmaduras (Kempermann, Kuhn et al. 1997). Además, se ha comprobado que el ejercicio aeróbico voluntario no solo mejora la salud de los animales, sino mejora algunas funciones cognitivas. Se ha observado que correr incrementa la proliferación de células progenitoras neurales en el GD

(van Praag, Kempermann et al. 1999). Por ello se decidió que proporcionar a los animales un ambiente enriquecido, provisto de una rueda para correr, túneles y objetos para roer es una de las maneras más asequibles de aumentar la proliferación neuronal en el hipocampo.

Otra situación a considerar es que, muchas de las condiciones que afectan a la proliferación de neuronas granulares en el GD, también afectan el aprendizaje dependiente de hipocampo, p. ej. estrés crónico y niveles de corticoesteroides circundantes altos (Gould and Tanapat 1999). Curiosamente esta relación también existe en sentido inverso, es decir, las cosas que aumentan la proliferación de neuronas en el GD, también mejoran el desempeño en tareas dependientes de aprendizaje hipocampal (Tanapat, Hastings et al. 1999). Lo que permite pensar que las nuevas neuronas hipocampales participan activamente en la modulación de conducta sustentada en memoria hipocampal.

Las evidencias de la función regulatoria en la memoria y el aprendizaje hipocampal de las neuronas nuevas, son contradictorias. Por ejemplo, Shors (2002) encontró que al reducir la neurogénesis hipocampal con una droga antimitótica (Acetato de metilazoximetanol, MAM) en el condicionamiento contextual, no se observa efecto alguno en la memoria de miedo. Meshi (2006) dice que el enriquecimiento ambiental aumenta la neurogénesis y mejora el aprendizaje espacial. De hecho, hay evidencia que indica que el aprendizaje de pruebas como el laberinto acuático de Morris y el condicionamiento de parpadeo promueven la supervivencia de las nuevas neuronas (Gould, Beylin et al. 1999).

No obstante, hay evidencia contundente que indica que eliminar la neurogénesis hipocampal adulta antes del aprendizaje de miedo contextual, no tiene consecuencias en el aprendizaje mismo ni en la expresión de la memoria. Sin embargo, si se prescinde de las nuevas neuronas después del mismo aprendizaje, la memoria no puede expresarse. Esta afectación es específica de memoria hipocampo dependiente, ya que otro tipo de memorias como el condicionamiento auditivo siguen expresándose correctamente (Arruda-Carvalho, Sakaguchi et al. 2011). De modo que la manipulación sobre las nuevas neuronas afecta la conducta si la memoria se ha formado previamente.

Dado que la extinción y el miedo al contexto son memorias dependientes de hipocampo, se ha propuesto que la neurogénesis hipocampal adulta puede estar afectando su modulación. Las nuevas neuronas del hipocampo pueden estarse integrando a los circuitos de las memorias previas y afectando su expresión. Sin embargo, se desconoce si su actividad puede afectar el regreso de miedo contextual tras una extinción exitosa. Dada la evidencia existente, proponemos el aumento de la neurogénesis hipocampal podría modificar las relaciones entre las memorias de extinción y regreso del miedo formadas con anterioridad.

Circuito neural del condicionamiento de miedo contextual.

Para que el condicionamiento de miedo se lleve a cabo, las rutas que transmiten la información del EI y del EC deben converger en la BLA, sin importar que tipo de condicionamiento sea (LeDoux 2000). En el condicionamiento contextual, el hipocampo es el encargado de formar y procesar la información del contexto, que es el EC.

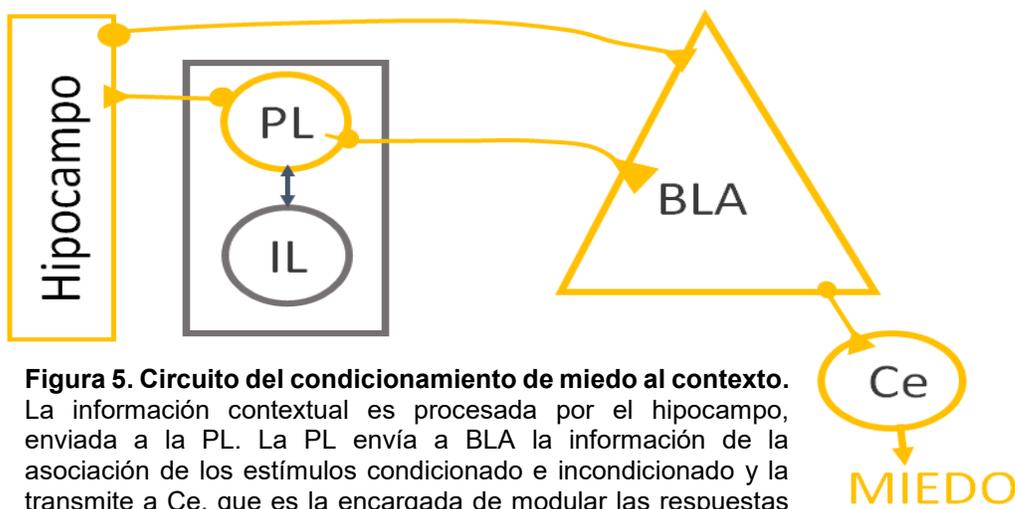


Figura 5. Circuito del condicionamiento de miedo al contexto. La información contextual es procesada por el hipocampo, enviada a la PL. La PL envía a BLA la información de la asociación de los estímulos condicionado e incondicionado y la transmite a Ce, que es la encargada de modular las respuestas conductuales de miedo como el congelamiento. PL, corteza prelámbica. IL, corteza infralámbica. BLA, amígdala basolateral. Ce, amígdala central.

Esta información llega a la BLA, donde converge con la información del EI (Canteras and Swanson 1992) que suele ser un choque eléctrico en las patas. Una vez que la información de ambos estímulos es asociada, la BLA la envía a la Ce, donde se controlan las respuestas de miedo. La Ce proyecta hacia las diferentes regiones encargadas de cada una de las distintas respuestas de miedo (LeDoux 2000).

La BLA envía a la Ce la información de las asociaciones entre estímulos necesaria para expresar las respuestas de miedo mediante dos rutas. La primera es una conexión directa entre la BLA y la Ce (Fendt and Fanselow 1999, Davis and Whalen 2001, Maren 2001). La segunda ruta es indirecta, ya que las proyecciones de BLA antes de alcanzar a Ce se conectan con la MCIT, que ejercen acción inhibitoria en Ce (Royer, Martina et al. 1999, Royer, Martina et al. 2000).

No obstante, la fuerza de la asociación entre los estímulos condicionado e incondicionado puede llegar a debilitarse y las respuestas de miedo dejan de expresarse. Cuando los animales se exponen por un tiempo prolongado al contexto que antes era peligroso, sin la presencia del evento aversivo, se genera una nueva memoria de seguridad asociada con este lugar, en un proceso denominado extinción

Extinción

¿Qué es la extinción?

El primero en observar y describir el fenómeno de inhibición de las respuestas condicionadas fue Pavlov. Empleando el protocolo de condicionamiento clásico, encontró que, si la respuesta condicionada de salivación producida por la asociación de un sonido con un estímulo apetitivo no era reforzada, esta respuesta disminuía a lo largo de los ensayos. Pavlov llamó a esto, extinción experimental (Pavlov 1927). Formalmente, la extinción es un proceso en el que la asociación entre los estímulos condicionado e incondicionado atenúa paulatinamente y la respuesta condicionada

se debilita (Sotres-Bayon, Cain et al. 2006, Sotres-Bayon and Quirk 2010, Goode and Maren 2014).

El estímulo que antes prevenía a los animales de un evento aversivo deja de hacerlo. Cuando los animales son expuestos únicamente al EC repetidamente, se forma una nueva memoria de seguridad. Esta memoria de seguridad y su expresión están sustentadas por las mismas estructuras que albergan a la memoria de miedo y regulan su expresión.

Estructuras que integran el circuito de la extinción

Se han identificado tres regiones clave en la extinción: la amígdala, el hipocampo, pero de manera muy especial la CPFm (Sotres-Bayon and Quirk 2010, Sotres-Bayon, Sierra-Mercado et al. 2012). La IL de la CPFm es la región de la corteza prefrontal que más se ha visto involucrada en la extinción (Sotres-Bayon and Quirk 2010). Con base en estudios moleculares, genéticos y farmacológicos se ha observado que la corteza IL es crítica durante el período de consolidación de la memoria de extinción (Sotres-Bayon and Quirk 2010), es decir, en la etapa posterior al aprendizaje, donde se afianzan los circuitos en el cerebro y que es dependiente de síntesis de proteínas.

Otra evidencia de la participación de la IL en la extinción se obtuvo usando la técnica de inmunohistoquímica para localizar la proteína c-Fos. Se encontró una mayor cantidad de células c-Fos+ en la corteza IL (lo que puede indicar mayor actividad en esta corteza) en las ratas que habían extinguido exitosamente (Knapska and Maren 2009, Sotres-Bayon and Quirk 2010). Por lo tanto, se considera a la IL una región clave dentro del circuito neural de la extinción.

La extinción es un proceso activo, ya que involucra la actividad de regiones tales como la amígdala, la corteza IL, la corteza PL y el hipocampo. Además de las relaciones entre estas estructuras. A continuación, se abordarán las estructuras que componen el circuito subyacente a la memoria de extinción y sus relaciones.

Circuito neural de la extinción

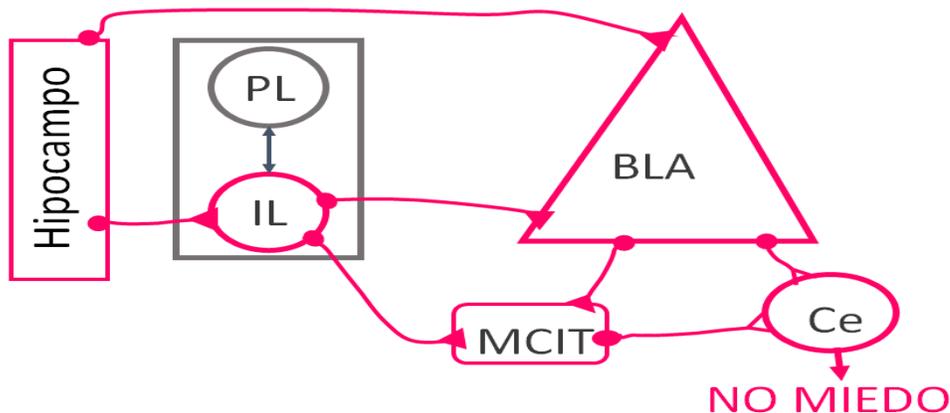


Figura 6. Circuito de la inhibición del miedo. El hipocampo recibe la información contextual y la envía a la IL que procesa la asociación entre los estímulos y excita a la MCIT, que a su vez inhibe a Ce. La BLA también se conecta con la MCIT, representando otra ruta para la inhibición de las respuestas de miedo. O bien puede inhibir a Ce directamente.

PL, corteza prelímbica. IL, corteza infralímbica, BLA, amígdala basolateral, MCIT, masa de células intercalas. Ce, amígdala central. Las flechas cerradas representan conexiones excitatorias, mientras que las abiertas, representan conexiones inhibitorias.

El hipocampo es una región importante en el circuito de la extinción, ya que recibe información contextual particular que transmite a la CPFm, específicamente a la IL. La IL se conecta excitatoriamente con la MCIT. La activación de estas células inhibitorias promueve el silenciamiento de la Ce, ya que estas conexiones son principalmente GABAérgicas. Cuando la Ce se inhibe, el miedo se reduce (Sotres-Bayon and Quirk 2010). Hay evidencia de que al inhibir a la MCIT se dificulta la

extinción, mientras que, si se activa esta región, la extinción se ve facilitada (Likhtik, Popa et al. 2008).

La participación de la amígdala es un poco más complicada de explicar, la BLA es determinante en la expresión del miedo, y se ha visto que dependiendo del tiempo en que BLA sea inactivada se evita el regreso del miedo tras la extinción, e incluso evita la expresión de la extinción. (Herry, Ciocchi et al. 2008). La BLA puede modular a la Ce mediante la activación de la MCIT que inhiben a la Ce.

Control de la expresión del miedo.

Una vez que la Ce ha sido inhibida, las respuestas condicionadas no se expresan. Sin embargo, la memoria de miedo no se borra o desaparece, sino que es inhibida por la memoria de extinción (Bouton 1988, Bouton 2002, Maren 2005, Goode and Maren 2014). La reducción del miedo después de la extinción está regulada por las conexiones de la IL y la PL con la amígdala. Las cortezas funcionan como reguladoras entre la BLA y Ce, modulando la conducta de miedo. Sin embargo, el hipocampo también es muy importante en la regulación del miedo. El hipocampo puede modular la plasticidad de la corteza prefrontal y la BLA (Sotres-Bayon, Cain et al. 2006). Ya que no solamente recibe y procesa información contextual, sino que excita a BLA y promueve las respuestas de miedo, pero también inhibe a PL usando la información que recibe de la amígdala (Sotres-Bayon, Sierra-Mercado et al. 2012).

El hipocampo envía información sobre los estímulos ambientales y de las memorias preexistentes, con esta información la corteza prefrontal hace una evaluación y excita o inhibe a la Ce. En estudios recientes la regulación del miedo

no solamente se ha restringido a la amígdala, la IL, la PL y el hipocampo, sino que una estructura muy poco estudiada llamada habénula, ha comenzado a figurar como parte importante de las estructuras que modulan la conducta emotiva.

Habénula

Es una región del cerebro altamente conservada a lo largo del linaje vertebrado. Es una región pequeña en la parte dorsal medial posterior del tálamo (Hikosaka 2010). La habénula se ha desarrollado evolutivamente de manera muy estrecha con la glándula pineal (Guglielmotti and Cristino 2006). Se ha planteado que recibe conexiones de la CPFm, entre muchas otras áreas y se conecta con el núcleo de Raphé, que es la principal fuente de serotonina en el cerebro y con el



Figura 7. Esquema de la regulación de la expresión del miedo. El hipocampo envía información de la memoria contextual preexistente a la IL, a la PL y a la BLA. La Hbl se conecta con la PL para promover las respuestas de miedo con base en la información sobre los estímulos presentes y las memorias emotivas preexistentes. La CPFm (IL y PL) integra y procesa toda la información señalizando a la BLA, que tiene la capacidad de inhibir o excitar a Ce promoviendo las respuestas de miedo o inhibiéndolas.

IL, corteza infralímbica. PL, corteza prelímbica. Hbl, habénula. BLA, amígdala basolateral. Ce, amígdala central. El color de la flecha del hipocampo indica que la información enviada puede derivar en promover o no las respuestas de miedo.

área ventral tegmental (VTA) que es una importante fuente de dopamina (Hornung 2003). En cuanto a sus funciones se ha propuesto que la habénula está implicada en diversas conductas con carga emotiva (Dafny and Qiao 1990).

Experimentos recientes han probado que la habénula es una región implicada en la modulación de la conducta basada en memorias previas con contenido emocional. Por ejemplo, la memoria de condicionamiento es una memoria negativa debido a la experiencia aversiva de choque, mientras que la de extinción es una memoria positiva, puesto que representa seguridad. Se ha visto que la habénula se activa en circunstancias donde el estímulo positivo está ausente (Hikosaka 2010). De modo que, se propone que la habénula evalúa la situación con base en la experiencia previa y promueve que se den las respuestas de miedo (Dafny and Qiao 1990).

La capacidad de los organismos de poder regular las respuestas de miedo les permite actuar de manera adecuada ante las situaciones que representan un verdadero riesgo para la supervivencia. Les permite dejar de temer cuando la situación deja de ser una amenaza. Como se había mencionado previamente, la memoria de miedo no se borra, sino que es inhibida por la memoria de extinción (Bouton 2002, Maren 2005, Goode and Maren 2014). Sin embargo, uno de los principales problemas en este sistema, es que el miedo no permanece inhibido indefinidamente, sino que suele regresar bajo algunas condiciones.

El regreso del miedo

El fenómeno de regreso del miedo se observa en animales de laboratorio y humanos por igual. De hecho, es la principal falla de las terapias de exposición a las que son sometidas muchas de las personas que sufren desórdenes como ansiedad, fobias o estrés post traumático (Vervliet, Craske et al. 2013). Una razón por la que el miedo suele regresar es que la memoria de miedo se adquiere más rápidamente y es persistente, mientras que la memoria de extinción es inestable (Goode and Maren 2014). Un rasgo fundamental de la memoria de extinción es su especificidad al contexto en que se lleva a cabo (Bouton and Bolles 1979, Bouton and Nelson 1994).

Hay que mencionar que, el contexto se refiere no solo a aquello que rodea al animal, sino al estado interno, que incluye el estado temporal (Goode and Maren 2014). En cambio, la memoria de miedo tiende a generalizarse entre los contextos, por lo que el miedo suele regresar bajo distintas circunstancias, casi todas relacionadas con el contexto (Bouton 2004, Rosas, Todd et al. 2013, Maren 2014). Se han identificado tres fenómenos distintos caracterizados por el regreso de miedo bajo diferentes condiciones contextuales, la renovación, la recuperación espontánea y la reinstalación (Orsini 2012).

Las 3 r (renovación, reinstalación y recuperación espontánea).

Renovación.

La renovación sucede cuando un EC, como un tono, que ha sido previamente extinto es proporcionado fuera del contexto donde se extinguió (Goode

and Maren 2014). Se ha observado que el regreso del miedo es particularmente fuerte si el EC se proporciona en el mismo contexto donde ocurrió el condicionamiento (Maren 2014). No obstante, el miedo puede renovarse en un contexto nuevo donde nunca se haya experimentado el EC, e incluso en un contexto ya conocido o familiar (Neumann and Kitlertsirivatana 2010, Polack, Laborda et al. 2013, Maren 2014). En resumen, la renovación del miedo condicionado ocurre siempre y cuando el animal reciba de nuevo el EC, fuera del contexto donde lo extinguió, y en general, en cualquier otro (Goode and Maren 2014).

Reinstalación

Otro fenómeno de recuperación del miedo es la reinstalación. Esta ocurre cuando el EI es proporcionado en ausencia del EC (Westbrook, Iordanova et al. 2002). En otras palabras, la respuesta condicionada, que había sido extinta, reaparece si el animal es sometido al EI de forma aislada (Bouton 2004). Entonces, para que ocurra el fenómeno de reinstalación, el choque deberá presentarse nuevamente, sin tono que lo prediga (Bouton 2002).

La reinstalación es dependiente del contexto, ya que durante la exposición del animal al EI sin el EC que solía predecirlo, ocurre una nueva asociación. El EI se asocia esta vez, con el contexto. Se ha planteado también, que la reinstalación del miedo está determinada por lo aversivo del EI. Probablemente exponer al animal nuevamente al evento aversivo al que fue condicionado, supone un recordatorio del contexto interno (estado de miedo) que tuvo durante el condicionamiento (Goode and Maren 2014).

Recuperación espontánea.

La recuperación espontánea es el regreso del miedo tras el paso del tiempo. Existen varias razones por las cuales el miedo regresa simplemente con el tiempo, pero se ha sugerido que se debe a cambios en el contexto temporal (Bouton 1988).

Cuando un animal es condicionado al contexto, aprende a temer a todos los elementos que forman parte del contexto. Todo evento está circunscrito a un espacio y aun tiempo, por lo que se ha llegado a pensar que el simple paso del tiempo promueve el regreso del miedo. Por lo que se explica a la recuperación espontánea como un tipo de renovación que ocurre en función del tiempo. Entonces la recuperación espontánea sucede cuando el EC se proporciona tiempo después, en un contexto temporal diferente (Bouton and Nelson 1994, Bouton 2002).

Una herramienta para evitar el regreso del miedo

Como prueba la existencia de estos tres fenómenos, la memoria de miedo permanece circunscrita a algún circuito neural, y cuando sucede la señal adecuada, el miedo vuelve a expresarse (Bouton 2004, Vervliet, Craske et al. 2013). Por ello el contexto es fundamental para el regreso del miedo.

Como se había mencionado previamente, la extinción es una memoria contextual por lo que es dependiente de hipocampo. Debido a este componente contextual que tienen en común la extinción y el regreso del miedo se piensa que el hipocampo juega un papel importante en la regulación de la conducta de miedo (Herkenham and Nauta 1977). También se piensa que, las nuevas neuronas generadas en la etapa adulta en el GD, podrían ayudar a modular las conductas

basadas en memorias dependientes del hipocampo. Por ejemplo, hay evidencia de que la ablación de la neurogénesis hipocampal postnatal mediante un transgénico impide la formación de la memoria de extinción (Deng, Saxe et al. 2009). Otra evidencia indica que, un grupo de ratones fue expuesto a una rueda de correr bloqueada, mientras que otro a una rueda libre esto, tras el condicionamiento contextual. Cuando ambos grupos fueron probados 6 semanas después, únicamente el grupo expuesto a la rueda libre no fue capaz de expresar la conducta de miedo en el contexto en el cual había condicionado. Además, se realizaron las cuantificaciones de DCX+ para evaluar las diferencias grupales en la cantidad de neurogénesis, siendo el grupo libre corredor el que más neurogénesis hipocampal tuvo (Akers, Martinez-Canabal et al. 2014).

Justificación, Objetivos e Hipótesis

Justificación

Tal como un organismo aprende a temer al contexto donde sufrió un evento aversivo, también es capaz de aprender a extinguir el miedo. Si los animales se exponen al contexto al que tenían miedo, pero sin el evento aversivo, la asociación entre ellos se debilita y las respuestas de miedo dejan de expresarse, es decir, el miedo se extingue. A pesar de una extinción exitosa el miedo tiende a regresar con el simple paso del tiempo.

Las terapias de exposición o extinción son un aspecto clave en los tratamientos de superación de miedos (Vervliet, Craske et al. 2013). Sin embargo, el miedo suele persistir y aunque la mayoría de personas pueden superar sus miedos, entre el 19% y 62% no lo logra (Craske, Treanor et al. 2014). En general todas las condiciones bajo las que el miedo vuelve dependen del contexto (Maren 2001).

El hipocampo es el área del cerebro encargada de procesar las memorias contextuales y episódicas. Además, es el encargado de procesar y almacenar la información de la extinción y el miedo contextual. Además de tener la característica de producir nuevas neuronas durante la vida adulta (neurogénesis postnatal). Existen evidencias contradictorias sobre el efecto que ejercen las nuevas neuronas sobre la conducta y la memoria dependientes de hipocampo. Hay evidencia de que afectan principalmente a memorias hipocampales formadas previamente a la

manipulación en la neurogénesis. No obstante, se desconoce su efecto específico en la regulación del miedo.

Por ello, partiendo de que la neurogénesis hipocampal puede afectar a las memorias preexistentes, se propone evaluar si el aumento de la neurogénesis hipocampal tras la extinción de un miedo condicionado al contexto previene el regreso del miedo. Este trabajo puede ser el inicio de investigaciones más profundas que deriven en mejores tratamientos contra los desórdenes de ansiedad y estrés postraumático.

Objetivos

Objetivo general

Determinar si el aumento de la neurogénesis hipocampal puede evitar el regreso del miedo contextual.

Objetivos particulares

1. Determinar si el aumento de la neurogénesis hipocampal tras la extinción evita el regreso del miedo condicionado.
2. Determinar si el aumento de la neurogénesis hipocampal antes de la extinción evita el regreso del miedo condicionado.
3. Determinar si el aumento de la neurogénesis hipocampal evita el regreso del miedo condicionado sin extinción.
4. Determinar si los cambios conductuales encontrados se asocian a la cantidad de células positivas a DCX.
5. Determinar si los cambios conductuales encontrados se asocian a la expresión de c-Fos.

Hipótesis

Si las nuevas neuronas pueden modificar las memorias preexistentes, entonces, el aumento de la neurogénesis tras el condicionamiento y la extinción, podrá afectar la expresión de estas y así evitar el regreso del miedo.

Material y Método

Sujetos

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar, provenientes del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM con edad de 2 meses y un peso promedio de 200 gr. El bioterio en el que los animales fueron acogidos durante la realización de los experimentos cuenta con la temperatura controlada ($22^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$) y la humedad relativa oscilando entre el 40 y el 79%. El ciclo luz/oscuridad al que fueron sometidas las ratas fue de 12/12 horas, las luces se encienden a las 7 AM y se apagan a las 7 PM.

Equipo conductual

Todas las pruebas conductuales se llevaron a cabo en cuatro cajas operantes (Coulbourn Instruments, Modelo Habitest). El programa con el que se diseñó el protocolo conductual en todos sus detalles, como la administración de los choques, la iluminación, la activación de las palancas y la liberación de pellets de azúcar, se llevó a cabo en el programa Graphic State 4 (versión 4.0.18 Software).

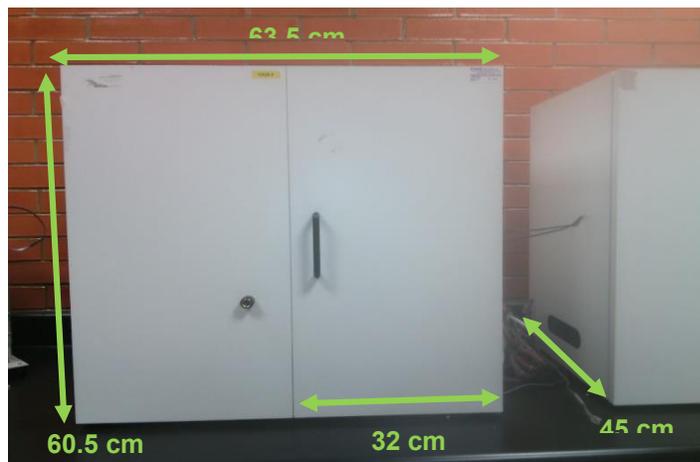


Figura 8. Caja de madera aislante. Dentro de esta caja, aislada del ruido y la luz exterior, se encuentra la caja de conducta de plexiglás transparente. El laboratorio cuenta con 4 cajas completas.

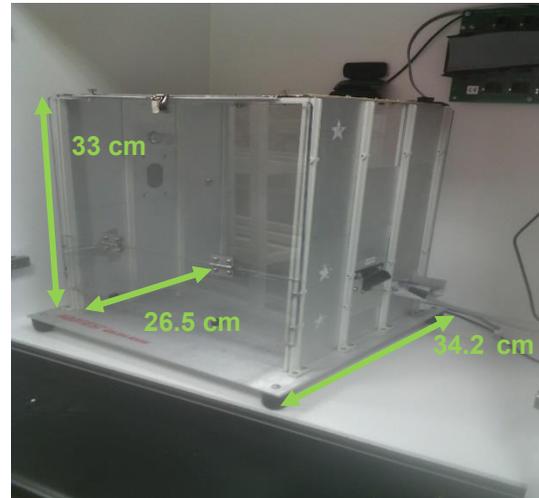
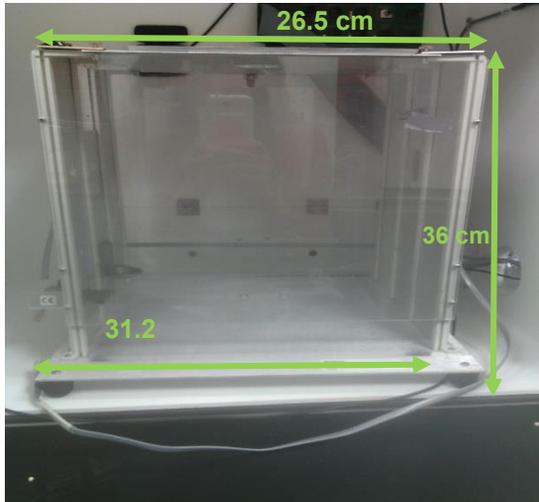
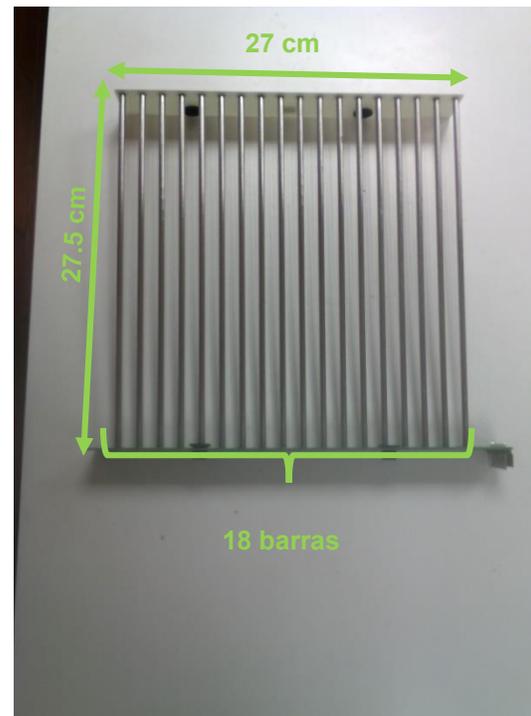
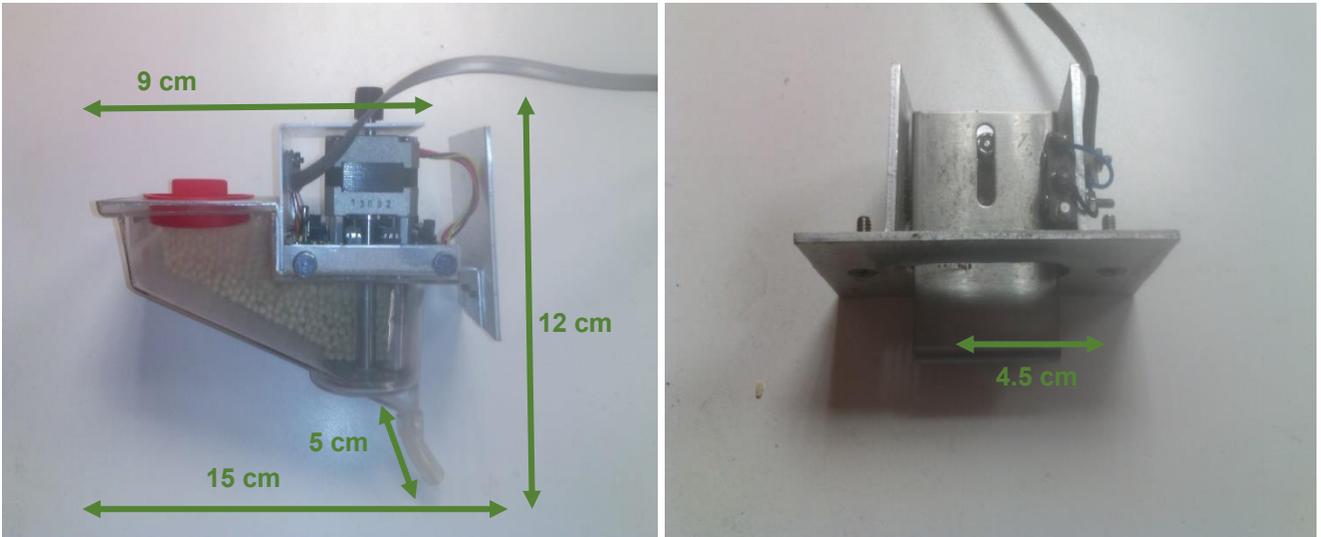


Figura 8.1 y 8.2 Caja de acondicionamiento operante, particularidades. Caja de plexiglás transparente. Imágenes de la caja desarmada. Las paredes frontal y trasera son de plexiglás transparente y las dos paredes laterales son metálicas. En flechas verdes se muestran las dimensiones de la caja.



Figuras 8.3 y 8.4 Caja de acondicionamiento operante, particularidades. Charola colectora y rejilla electrificada. Charola colectora y rejillas dispensadoras de choques eléctricos. La charola colectora se coloca debajo de la rejilla embonando con las dos pequeñas protuberancias que están en la parte de atrás. La rejilla tiene 18 barras de metal con un espacio entre ellas de 1 cm y con 0.5 cm de circunferencia.



Figuras 8.5 y 8.6. Caja de acondicionamiento operante, particularidades. Dispensador de pellets y palanca (mecanismo). El dispensador de pellets se coloca en la parte lateral de la caja conectado por la manguera al comedero. La palanca se coloca dentro de la caja en una de las paredes metálicas al lado del comedero, ambos dispositivos van conectados al centro de control de la caja.

Restricción de Alimento

Durante el primer día de su ingreso al bioterio, las ratas tuvieron comida y agua *ad libitum*, fueron pesadas y el peso fue registrado para llevar un monitoreo constante. Al día siguiente, los animales fueron privados de la comida sólida (pellets BIOINVERT) y restringidos en la dieta, para llevarlos al 90% de su peso inicial. Durante 7 días se les proporcionaron 2 ½ pellets de comida (15 gr. aprox.).

Moldeamiento y Entrenamiento

El palanqueo es un índice complementario a la medida del congelamiento, es de gran utilidad porque le da mayor robustez, ya que el programa con el que es medido el congelamiento puede cometer errores. Algunos errores frecuentes con el uso de estos programas son, contar como congelamiento inmobilizaciones parciales de la rata, efectos de la respiración o efectos de la iluminación. Esto nos asegura

de algún modo que el panorama de la conducta a cuantificar se reduzca a que el miedo se exprese en congelamiento y el no miedo en palanqueo.

Una vez que los animales llegaron al 90% de su peso inicial se les enseñó a presionar una palanca para obtener un pellet de sabor dulce como recompensa (Bio-Serv Dustless Precision Pellets 45mg). Esto se logró a través de un proceso de moldeamiento. En el moldeamiento se refuerzan todas las acciones que aproximan al individuo a una conducta deseada, en este caso, presionar una palanca constantemente. El entrenamiento de palanqueo o moldeamiento se realizó durante 7 días, dentro de la caja de conducta previamente descrita, pero en un contexto diferente (se describe a continuación).

Contexto de moldeamiento y entrenamiento

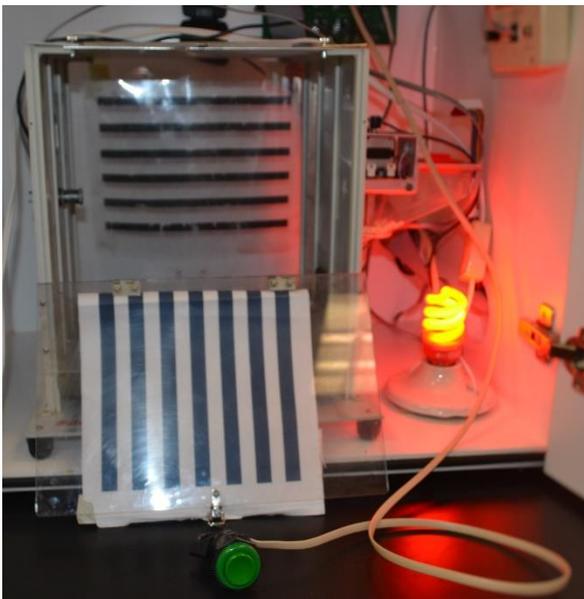


Figura 9. Vista exterior de la caja de moldeamiento.



Figura 9.1. Vista interior de la caja de moldeamiento.

En las caras internas metálicas de la caja se pegaron objetos reflejantes con formas estrelladas en patrones diferentes, mientras que, en las paredes plásticas de plexiglás transparente se pegaron patrones rayados. En la cara distal se colocó un patrón horizontal de 6 franjas negras de 1.5 cm de grosor y 23.6 cm de largo, por 5 franjas blancas de las mismas dimensiones. En la cara proximal se colocó un patrón de franjas verticales de 7 franjas azul marino de 1.5 cm de grosor y 22.3 cm de largo, por 6 franjas blancas de las mismas dimensiones.

Día 1 (moldeamiento): Previo al inicio del protocolo conductual se colocan pellets dulces (Bio-Serv) humedecidos con agua en el comedero. Con el objetivo de promover que los animales se acerquen a la zona del comedero y la palanca. El moldeamiento dura 35 minutos, durante este día se les enseña a los animales la asociación de la palanca y la comida. Por ello deben estar lo suficientemente motivados en la búsqueda de comida. Con un obturador se refuerza dando a la rata un pellet dulce cada vez que hace una acción cercana a presionar la palanca. Cuando las ratas logran presionar la palanca por sí solas varias veces, estas acciones no se refuerzan más.

Día 2 (Inicio del entrenamiento propiamente dicho): A diferencia del día 1, todos los otros días tienen una duración de 30 minutos. En el día 2, los pellets dulces se entregan en una razón fija de 1, esto significa que cada vez que la rata presione la palanca se le proporcionará un pellet.

Día 3: Los primeros 5 minutos del tiempo total de la duración de la sesión, la liberación de pellets dulces ocurre en razón fija de 1. Al término de este tiempo el intervalo variable cambia a 15. Esto significa que el pellet dulce va a entregarse en

un intervalo de tiempo aleatorio de en promedio 15 s después de la última vez en que la palanca fue presionada. Y permanece así los 25 minutos restantes.

Día 4: Durante los primeros 5 minutos, la liberación de pellets dulces ocurre en intervalo variable de 15s. Al término de este tiempo, el intervalo variable cambia a 30s y permanece así los 25 minutos restantes.

Día 5: Durante los primeros 5 minutos de la sesión la liberación de pellets dulces ocurre en intervalo variable de 30s. Al término de este tiempo, el intervalo variable cambia a 60s y permanece así los 25 minutos restantes.

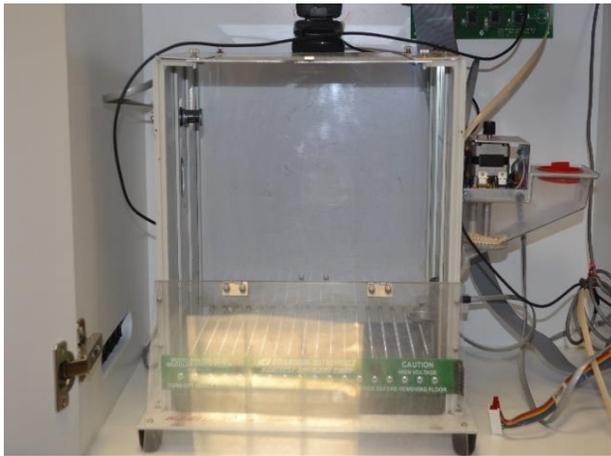
Día 6: Durante la sesión completa los pellets se entregan en intervalo variable de 60s. Este es el último día de entrenamiento de palanqueo.

Nota: El cambio en los intervalos se debe a que los animales logran aprender a predecir los intervalos fijos y no presionan la palanca, mientras que los intervalos variables cada vez mayores promueven que, los animales nunca dejen de presionar la palanca mientras estén lo suficientemente hambrientos.

Condicionamiento.

Contexto del condicionamiento

El condicionamiento contextual al miedo se lleva a cabo en la misma caja donde los animales fueron entrenados a palanquear, pero en un contexto distinto. Las paredes de plexiglás permanecen transparentes, se retiran las pistas espaciales brillantes de las paredes metálicas y el piso se reemplaza con un piso de barras metálicas. Una lámpara amarilla se coloca sobre la caja y hay ruido blanco durante todo el condicionamiento.



Figuras 10. Vista exterior de la caja de condicionamiento.



Figura 10.1 Acercamiento al interior de la caja.

Condicionamiento al contexto

La duración del condicionamiento es de 15 minutos. Se sometió a los animales a 5 choques eléctricos de 1 mA en intervalos variables de en promedio 120 s, cada choque con una duración de 2 s. El dispensador de alimento estuvo activo en intervalo variable de 60s. durante todo el condicionamiento.

Extinción

La extinción ocurre en el mismo contexto donde se llevó a cabo el condicionamiento, con una duración de 50 min. Durante la extinción los animales no fueron sometidos a ningún choque eléctrico, solamente fueron expuestos al contexto. El despachador de comida se mantuvo activo durante la extinción y las pruebas en intervalo variable de 60 s.

Prueba 1

La prueba 1 se proporcionó en el mismo contexto que el condicionamiento y la extinción. Su duración fue de 10 min. Al finalizar la prueba 1 se separó a los animales en grupos (control y experimental). Ver más abajo el apartado de separación de grupos.

Prueba 2

La prueba 2 se realizó en el mismo contexto que los eventos conductuales previamente mencionados. Con una duración de 10 minutos. Sin embargo, 90 minutos después de la prueba todos los animales fueron sacrificados y perfundidos. Fueron inyectados con hidrato de cloral (Sigma Aldrich, 400 mg/ml). Una vez que no presentaron respuesta a la estimulación mecánica en patas y cola, su corazón fue expuesto y el ventrículo izquierdo conectado. El corazón se conectó con una jeringa unida a una manguera en contacto con los depósitos de salina y paraformaldehído. La solución fue forzada mediante una bomba peristáltica (Masterflex L/S 77240-00 100 RPM). Primero se les hicieron circular 200 ml de solución salina (Baker 0.9%) y posteriormente fueron fijados con 200 ml de paraformaldehído-PBS (Sigma 4%).

Separación de grupos

La separación de grupos se hizo según el desempeño de los animales en la prueba¹ (se utilizó el parámetro de congelamiento). Se hicieron dos grupos aleatoriamente y tras realizar una Prueba de t, se buscó manualmente la organización cuya p fuera lo más cercano a $p=1$, de este modo se obtuvieron el grupo Control y el Grupo Enriquecido.

Grupos: enriquecimiento ambiental y control

Ambos grupos permanecieron durante 30 días. Al grupo enriquecido se le proporcionó en su caja hogar una rueda para correr, un túnel de PVC en forma de L y maderas de colores para roer, mientras que el grupo control únicamente permaneció en su caja hogar. Los animales de ambos grupos cohabitaron en grupos de máximo 3 individuos.



Figuras 11. Grupo control.



Figura 12. Grupo con enriquecimiento ambiental.

Experimentos

PostExt

24 horas después de haber concluido el entrenamiento de palanqueo, las ratas fueron sometidas al condicionamiento (día 1). Al día siguiente (día 2) los animales extinguieron el miedo y fueron regresados inmediatamente después a sus cajas hogar. En el día 3, se realizó la prueba 1, al concluir la prueba los animales fueron separados en grupos, con libre acceso a comida y agua, esto duró 30 días. Al concluir los 30 días, se tomaron 5 días más para que los animales bajaran al 90% de su nuevo peso y que estuvieran motivados en la búsqueda y presión de la palanca. En el día 39 se realizó la prueba 2.

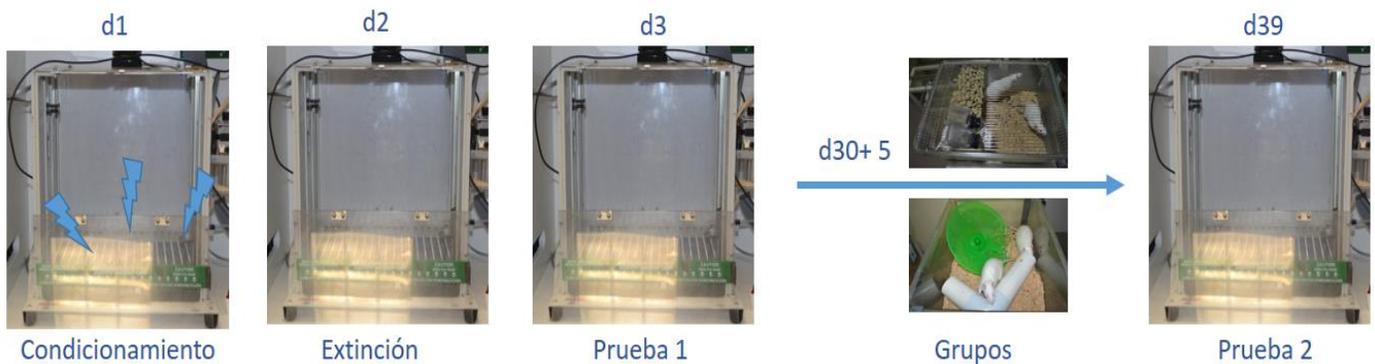


Figura 13. Diseño experimental: PostExt

PreExt

24 horas después de haber concluido el entrenamiento de palanqueo las ratas fueron sometidas al condicionamiento (día 1). Al finalizar la sesión de condicionamiento, los animales fueron separados en grupos, con libre acceso a comida y agua por 30 días. Al término de los 30 días, se tomaron 5 días más para que los animales bajaran al 90% de su nuevo peso. En el día 37 se realizó la extinción y 24 horas después (día 38) la prueba 1. A las 24 horas subsecuentes (día 39) se llevó a cabo la prueba 2.

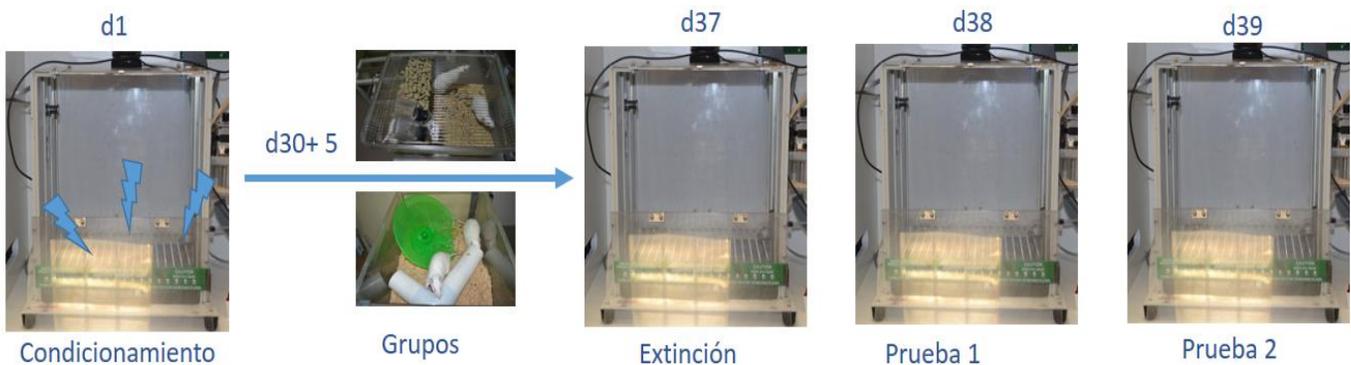


Figura 14. Diseño experimental PreExt

NoExt

24 horas después de haber concluido el entrenamiento de palanqueo las ratas fueron sometidas al condicionamiento (día 1). En este protocolo no se proporciona sesión de extinción. En el día 2 se realizó la prueba 1 y se agrupó a los animales con libre acceso a comida y agua durante 30 días. Al concluir estos 30 días se tomaron 5 más para bajarlos de peso al 90%. En el día 38 se hizo la prueba 2.

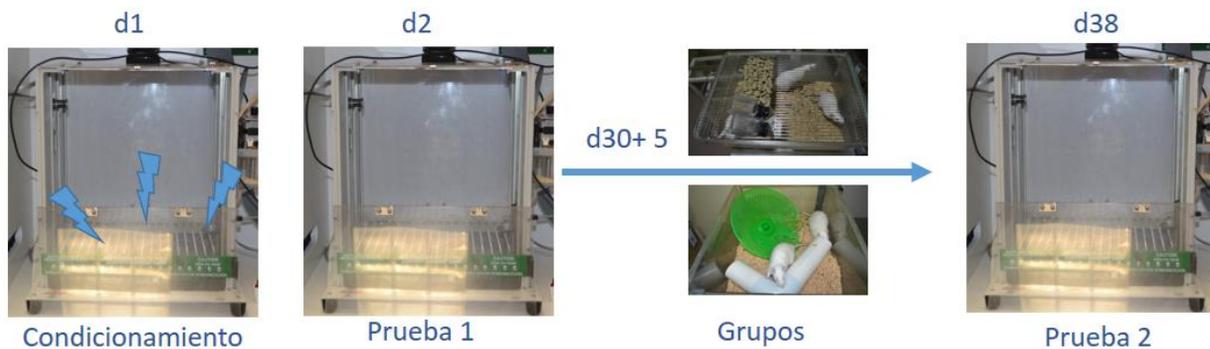


Figura 15. Diseño experimental NoExt

Inmunohistoquímica

Los cerebros fueron removidos del cráneo de los animales tras la perfusión, almacenados en PFA al 4% durante una semana y cambiados a una solución de sacarosa para crioprotección (Sigma Aldrich) 30% en PBS (buffer de fosfatos, compuesto por Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 y NaCl) por máximo 4 días o hasta un mes en refrigeración a 4° C.

Crioseccionamiento

Los cerebros fueron cortados en secciones de 50 μm en el criostato (Leica CM1520) a -25°C . Las secciones se almacenan en cajas de cultivo llenas de anticongelante (glicerol Baker 40%, etilenglicol Baker 10 % y PBS 1x). Se colecta en cada pozo una serie completa, que incluye cortezas prefrontales, amígdala, hipocampo dorsal e hipocampo ventral en intervalos de cada 300 μm . Los cortes se almacenan a -20°C de forma permanente. Unas horas antes de iniciar el proceso de inmunohistoquímica las rebanadas se montan en un portaobjetos previamente gelatinizado (ver sección de gelatinizado de laminillas al final de esta sección). Para facilitar el montaje se colocan los cerebros en una caja de Petri en libre flotación con PBS 1x. Una vez montadas, las secciones se dejan secar y tras verificar que estén perfectamente secas se puede iniciar el proceso.

Día 1 Inmunohistoquímica de c-Fos

En primer lugar, se dejan las secciones 30 minutos en formalina dentro de cajas coplin, seguido de unos lavados cortos de 2 min de PBS. Tras esto, se somete a las secciones a un gradiente de alcohol etílico en diferentes concentraciones (Sigma-Aldrich). Se sumergen las laminillas en los siguientes alcoholes 70%, 100% no. 1, 100% no. 2 y Xilenos (Sigma-Aldrich) por 5 minutos en este orden y de regreso durante 2 min. Al finalizar se hace un lavado con PBS, durante 2 min. Este paso tiene como propósito fijar las secciones a las laminillas y extraer todos los residuos lipídicos de las secciones.

El siguiente paso es la recuperación de los sitios antigénicos. Durante este, las secciones se colocan en buffer de citratos (0.1 M con NaOH 1N se lleva el pH a

6.0) con Tween 0.05% (Sigma-Aldrich). Se calientan dentro de una olla exprés durante 20 minutos. Se dejan enfriar fuera de la olla, pero dentro del buffer durante otros 20 minutos. Tras lo cual se realizan 2 lavados cortos en PBS de 2 mins cada uno. Este paso tiene como propósito regresar las proteínas de las secciones a su estructura secundaria.

A continuación, se realiza el bloqueo de peroxidasas en una solución 1:10 de H₂O₂ (Sigma 30%) en PBS durante 10 min. Al finalizar, se hacen dos lavados cortos en TBS-T (buffer Trizma base compuesto por, Trizma base, NaCl y H₂O a pH 7.4). Esto tiene como finalidad inhabilitar las peroxidasas endógenas que podrían producir ruido de fondo y contaminar la señal final. Después se separan las secciones con una navaja, se colocan en una caja de cultivo de 12 pozos y se coloca 1 ml de solución de bloqueo de proteínas (2% de albumina sérica bovina, 2% de suero normal de cabra y 5% de TBS-T 20x) por pozo. Se deja en agitación a temperatura ambiente por 1 hora a 80 rpm. Este paso tiene como objetivo bloquear las proteínas cargadas que puedan retener inespecíficamente a los anticuerpos. Además de bloquear los residuos inmunes que podrían unirse inespecíficamente a los anticuerpos.

El anticuerpo primario (Anti-c-Fos (Ab-5) (4-17) Rabbit Antibody Policlonal MILLIPORE/CALBIOCHEM) se diluye 1:2500 en una dilución 1:2 de una solución de bloqueo de proteínas en TBS-T. Tras finalizar el bloqueo de proteínas, se retira la solución con una micropipeta. Sin lavar se coloca 1 ml de la solución del anticuerpo en cada pozo. Esta solución debe permanecer 48 horas en agitación, a temperatura ambiente a 90 rpm.

Día 2 inmunohistoquímica

Se retira la solución de anticuerpo primario. Después, se realizan 6 lavados cortos con TBS-T de 10 min a 100 rpm. Al finalizar los lavados, se prepara una dilución 1:2 de solución de bloqueo de proteínas en TBS-T. El anticuerpo secundario (Anti Conejo IgG biotinilado-SP-AffiniPure (H+L) JACKSON IMMUNORESEARCH) se diluye en esta solución en una concentración 1:2000. Se colocan las rebanadas en pozos limpios con 1 ml de la solución del anticuerpo y se deja una hora en agitación. Al finalizar la hora de incubación se realizan 3 lavados cortos de TBS-T de 10 minutos cada uno. Tras el tercer lavado, se prepara la solución ABC en TBS-T, a una concentración de 1:250 (kit de ABC 1:250 de A y 1:250 de B) (VECTASTAIN® Elite ABC-Peroxidase Kits Standards). Se deja en agitación hasta su uso 30 min después. Se realizan otros 3 lavados en agitación con TBS-T 1x. Al finalizar, se colocan los tejidos en pozos limpios con 1ml de la solución ABC por pozo y se deja en agitación durante 1 hora a 100 rpm. Al finalizar la hora de reacción de los tejidos en la solución ABC, se realizan 6 lavados cortos en TBS-T en agitación a 120 rpm.

Para revelar se colocan las rebanadas de tejido en pozos limpios y se prepara una solución de DAB-Ni en TBS-T 1ml por cada pozo. La solución de revelado se prepara con DAB, níquel y H₂O₂ en concentración 1:60 DAB, 1:60 Ni y 1:4000 H₂O₂. Una vez que se prepara la solución se deja reaccionar 5 minutos y se monitorea la señal en el microscopio constantemente. Una vez que se encuentre la señal esperada o hayan pasado 15 minutos, la reacción de revelado se para llenando el pozo con TBS-T 1x frío. Finalmente se realizan 3 lavados cortos con TBS-T. Los corte pueden quedarse en el último lavado de TBS-T por algunas horas.

Para detectar por inmunohistoquímica la proteína DCX, el protocolo que se sigue es exactamente el mismo, con diferencia del anticuerpo primario. El anticuerpo primario para DCX (Cell Signaling Technologies, Rabbit Ab Lot.3 #46045) se utiliza en concentración 1:5000. El anticuerpo secundario es el mismo que para c-Fos y en la misma concentración.

Contratinción

Para contrateñir es necesario que las rebanadas de cerebro estén montadas en un portaobjetos gelatinizado. Como primer paso, se colocan en una solución de verde de metilo (Sigma) al 1% por 20 min y al finalizar el tiempo, se enjuagan con agua destilada hasta que el agua corra limpia. Se somete a las laminillas a 30 baños de un segundo en alcohol al 95%, a 2 minutos en alcohol 100% no. 1, a 2 minutos en alcohol 100% no. 2 y se les coloca en Xilenos hasta ser montados con Permout (Fisher Scientific). Finalmente, se coloca el Permout y un cubreobjetos (MADESA M.I.R 100 24x50 mm) encima, cuidando no dejar burbujas de aire. Las laminillas se dejan secar aproximadamente 3 días y están listas para ser fotografiadas.

Microfotografías y procesamiento de las imágenes

Se utilizó un microscopio Nikon eclipse Ci con una cámara fotográfica Nikon Qimaging micropublisher 5.0 RTV. Las fotografías para cuantificar cFos se tomaron con el objetivo de 10x NA= 0.30. De cada laminilla se tomaron las fotografías necesarias para cubrir toda la estructura de interés en cada uno de los cortes (Gd, CA1, CA3, BLA, Ce, Hbl, Prl o IL) usando el software QcapturePro 4 (Qimaging versión 7.05). Las células se contaron usando el software ImageJ 1.48v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Las fotografías de DCX se tomaron

con el objetivo 1x NA 0.04. Las células se contaron manualmente con el objetivo 40x NA 0.75.

Procesamiento de los datos obtenidos

Las gráficas correspondientes a cada estructura fueron realizadas con el programa GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) y los análisis estadísticos se realizaron con el paquete STATISTICA (StatSoft, versión 10). Los análisis estadísticos usados fueron análisis de varianza de dos vías y medidas repetidas, pruebas de t y correlaciones.

Conteo y análisis de cFos.

El conteo de células positivas a c-Fos se realizó de manera semimanual usando el programa ImageJ. Una vez que se formó una base de datos del área de la estructura fotografiada y el número de células presentes, se obtuvo la densidad y se promedió. Con ello se formó una nueva base de datos para obtener el Z-score. El Z-score es un indicador de la diferencia en la expresión de las células positivas a c-Fos entre los grupos.

La fórmula del Z-score es la siguiente: la diferencia de las medias de ambos grupos se divide entre la raíz cuadrada de la suma del cociente de la varianza cuadrada entre la n de cada grupo, lo que nos permite obtener los datos para hacer una gráfica donde es posible conocer la dirección de la diferencia en la expresión de c-Fos, es decir que grupo tiene más y saber que tan grande es esta diferencia.

$$Z = \frac{\mu_a - \mu_b}{\sqrt{\frac{\sigma_a^2}{n_a} + \frac{\sigma_b^2}{n_b}}}$$

Fórmula del Z-score

Para procesar las imágenes de DCX se usó la siguiente fórmula

$$\Sigma = \frac{(A_1 \dots A_n)(d_1 \dots d_n)}{AT}$$

Fórmula para analizar las imágenes de DCX

Donde A es el área, d es la densidad y AT es el área total, con ella se calcularon las medias pesadas para realizar las gráficas y los análisis estadísticos. Se empleó estadística paramétrica y se emplearon diversos estadísticos entre ellos, pruebas de t y MANOVA de medidas repetidas.

Gelatinización de las laminillas

Las laminillas se gelatinizan usando una solución 1% gelatina comercial Knox y 10% de crómaloamina (Sigma). Se calienta agua destilada y se disuelven los reactivos hasta alcanzar una temperatura de máximo 40° C. Se deja reposar la solución entre 10-15 min a esta temperatura y se sumergen las laminillas. Deben dejarse secar por lo menos 24 horas. Para poder montar los tejidos en las laminillas, éstas deben estar realmente secas.

Resultados

El objetivo principal de este trabajo fue saber si el regreso del miedo condicionado asociado a un contexto puede evitarse aumentando la neurogénesis hipocampal tras la extinción. Se hicieron experimentos donde se enseñó a un grupo de animales a temer a un contexto y se incrementó la neurogénesis antes, después y en ausencia del entrenamiento de extinción. Tras realizar una prueba del regreso del miedo, los animales fueron sacrificados y sus cerebros reservados para inmunohistoquímica contra las proteínas DCX y c-Fos.

El enriquecimiento ambiental aumenta la neurogénesis hipocampal y proporcionado tras la extinción evita el regreso del miedo.

Una vez que los animales concluyeron exitosamente el entrenamiento de palanqueo fueron condicionados al miedo (Figura 16 A). Durante los primeros 5 minutos del condicionamiento, el congelamiento de los animales es prácticamente nulo. Conforme se presentan los choques, el contexto se asocia con la experiencia aversiva y los animales expresan respuestas de miedo. El congelamiento al inicio del es significativamente menor que al final del condicionamiento (ANOVA de medidas repetidas $F_{1,19} = 14.8$ $p < 0.0001$). De hecho, este sucedió en ambos grupos, por lo que no hay diferencias entre ellos (ANOVA de medidas repetidas $F_{1,19} = 2.28$ $p < 0.05$). Es decir, ambos grupos lograron condicionar correctamente.

En la extinción (Figura 16 B) se dejó a los animales 50 minutos en la caja sin descarga eléctrica alguna. El tiempo que los animales pasan congelados es muy alto al inicio de la extinción y baja conforme avanza la prueba. (ANOVA medidas repetidas $F_{1,19} = 10.70$ $p < 0.05$). Ambos grupos lograron extinguir correctamente, por lo que no hay diferencias entre grupos ($F_{1,19} = 0.007$ $p > 0.05$).

Sin embargo, la memoria de miedo es bastante persistente así que, para asegurarnos de que la extinción se aprendió correctamente y que los animales ya no temen al contexto se realizó la primera prueba 24 horas después de la extinción. Durante la prueba 1 (Figura 16 C) ambos grupos de animales fueron reexpuestos al contexto durante 10 minutos.

Los dos grupos aprendieron bien que el contexto ya no es peligroso, esto se manifiesta en la reducción del congelamiento durante la prueba. El promedio del miedo cuantificado en ambos grupos no fue diferente ($t_{19} = 0.52$ $p > 0.05$), es decir, ambos grupos, lograron aprender correctamente a extinguir.

Al término de la prueba 1, los animales se separaron en grupos y se dejaron un mes en enriquecimiento ambiental o en cajas hogar control. Con el fin de saber si el miedo había logrado persistir a pesar de una extinción exitosa, se realizó la prueba 2 al finalizar el mes de tratamiento (figura 16 D).

El promedio del congelamiento que mostró el grupo enriquecido durante la prueba 2, es menor que el del grupo control ($t_{19} = 2.30$ $p < 0.05$). Es decir, los animales que vivieron un mes en enriquecimiento ambiental, tuvieron una menor cantidad de miedo en comparación con el grupo control. El palanqueo es un parámetro auxiliar que enriquece la información obtenida con el congelamiento. Durante la prueba 2 (figura 16 E), el grupo enriquecido palanqueo en promedio más veces por minuto que el grupo control ($t_{19} = 3.56$ $p < 0.01$).

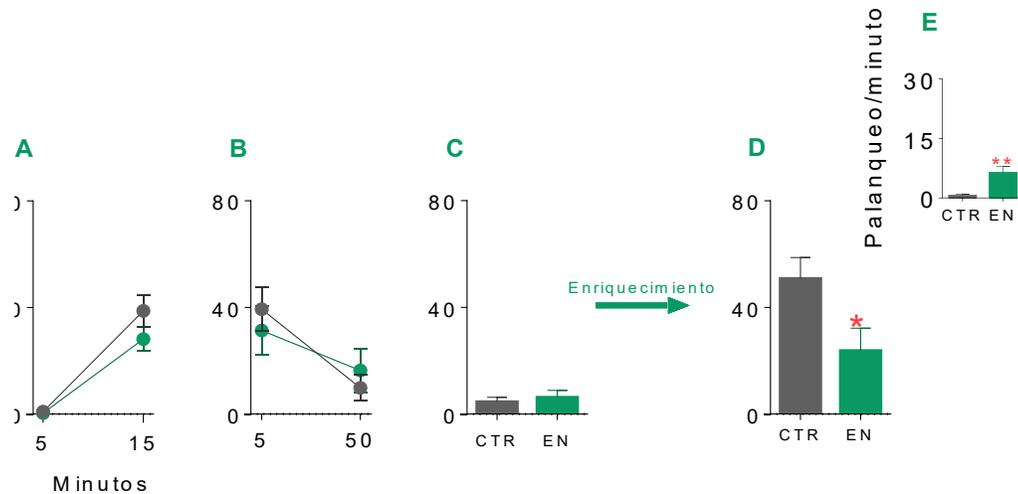


Figura 16. El enriquecimiento ambiental tras la extinción evita la recuperación espontánea del miedo. (A) Ambos grupos condicionaron correctamente. (B) La extinción se llevó a cabo de manera correcta (C) La memoria de extinción fue bien adquirida (D) El grupo enriquecido no sufrió recuperación espontánea (E) Esto es sustentado por el palanqueo. Enriquecidos n=10 Control n= 11
* p<0.05 ** p<0.01

Para observar con mayor claridad si hubo un fenómeno de recuperación espontánea del miedo, se comparó la conducta de ambas pruebas entre ambos grupos (figura 17 A y B).

Como se había mencionado previamente, durante la prueba 1 ambos grupos tuvieron la misma cantidad de miedo. No obstante, al analizar los datos obtenidos con una ANOVA de dos vías y medidas repetidas, se obtiene un estadístico significativo en la interacción de los factores ($F_{1, 19} = 6.7$ $p < 0.05$), por lo que posteriormente se realizaron pruebas post hoc Tukey para determinar entre qué factores radicaba esta diferencia.

Se encontró que el congelamiento mostrado por el grupo control durante la prueba 2 es mucho mayor que el mostrado por el mismo grupo durante la prueba 1 ($p < 0.001$). Como ya se había observado previamente, el congelamiento entre los grupos es diferente durante la prueba 2 ($p < 0.05$).

El enriquecimiento ambiental promueve el aumento en la neurogénesis

Con el fin de comprobar que el enriquecimiento ambiental promueve el aumento de la neurogénesis, se realizó inmunohistoquímica para localizar y cuantificar la proteína DCX. Se sabe que esta proteína se expresa únicamente en células progenitoras neurales y neuronas inmaduras (des Portes, Pinard et al. 1998, Francis, Koulakoff et al. 1999). Por lo tanto, es un indicador confiable de los niveles de neurogénesis (Brown, Couillard-Despres et al. 2003). Se encontró que los animales del grupo enriquecido tuvieron una mayor cantidad de células positivas a DCX que los animales control (figura 18 A). Los datos fueron analizados con una prueba de t no pareada ($t_{19} = 3.43$ $p < 0.01$).

La neurogénesis hipocampal promovida por el enriquecimiento ambiental correlaciona positivamente con la disminución de las respuestas de miedo.

Con base en este resultado se consideró necesario determinar si existía una correlación entre la neurogénesis y la conducta de inmovilización (figura 18 B) y el palanqueo (figura 18 C).

En cuanto a la correlación del congelamiento y la DCX+ (figura 18 B), la ecuación es $y = -0.09278x + 70.18$ $r = 0.64$ donde “y” es la variable dependiente que corresponde al porcentaje de congelamiento, mientras que “x” es la variable independiente que corresponde a la cantidad de células DCX+. El valor de $p < 0.01$, por lo que la correlación es significativa. La $r = -0.64$ indica que sí existe una

correlación entre estas variables. Sin embargo, la pendiente negativa, indica que la relación entre variables es inversa. La $r^2 = 0.407$ indica que el 40% del cambio en que ocurrido en la variable y, se debe la relación lineal entre ambas variables.

Esto significa hay una correlación inversa entre la cantidad de células DCX+ y el congelamiento, por lo tanto, mientras más células DCX+ se encuentren, menor habrá sido el congelamiento de ese animal durante la prueba 2. No obstante, el 40% de este cambio en el porcentaje de congelamiento puede deberse a su relación con las células DCX+.

Se encontró que la correlación del palanqueo por minuto y la cantidad de células DCX+ tiene una $r = 0.50$ y una ecuación: $y = 0.01210x - 0.6789$. La correlación es significativa $p < 0.01$. La $r^2 = 0.25$. Por lo tanto, se puede inferir que existe una correlación positiva entre el palanqueo/minuto y la cantidad de células DCX+, y que aproximadamente el 25% del palanqueo se debe la relación de este con las células DCX+. Entonces, un mayor número de neuronas DCX+ correlacionan con conductas relacionadas con la disminución de las respuestas de miedo.

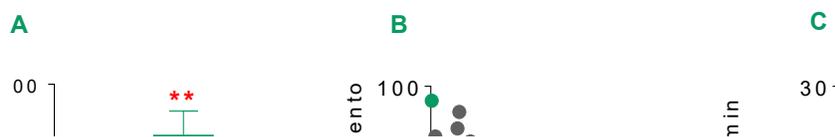


Figura 18. El grupo Enriquecido presenta más DCX que el Control y ésta DCX se relaciona con la conducta. (A) Conteo de células DCX+ por mm^2 . El grupo enriquecido muestra más DCX+ que el grupo control, esto indica que el enriquecimiento ambiental aumenta la neurogénesis hipocampal. **(B)** Diagrama de dispersión entre el congelamiento y DCX+. Mientras más DCX+ tenían los animales, menos se congelaron. $P < 0.01$ **(C)** Diagrama de dispersión entre el palanqueo/minuto y DCX+. Mientras más DCX+ más palanquearon los animales durante la prueba 2. $p < 0.01$ ** $p < 0.01$

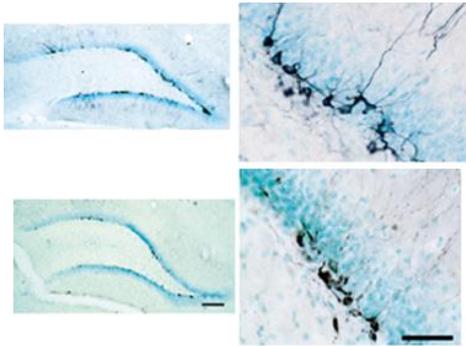


Figura 18.1 El grupo Enriquecido presenta más DCX que el Control. Fotografías superiores. Animal que habitó en ambiente enriquecido (1x y 40x). Fotografías inferiores. Animal que habitó en una caja hogar control (1x y 40x).

Activación diferencial en hipocampo, corteza prefrontal y habénula.

Una manera certera de saber si un área del cerebro estuvo activa, es realizar inmunohistoquímica para localizar c-Fos (Herdegen, Kovary et al. 1995). Se sabe que esta proteína se expresa tras haberse rebasado el umbral de despolarización de la membrana, es decir, únicamente tras un potencial de acción, por lo que es un marcador confiable de actividad neuronal reciente (Muller, Bravo et al. 1984).

Tras realizar las tinciones, se contó la cantidad de células positivas a c-Fos. Con el promedio de los conteos celulares se obtuvo el Z-Score, que es un indicador

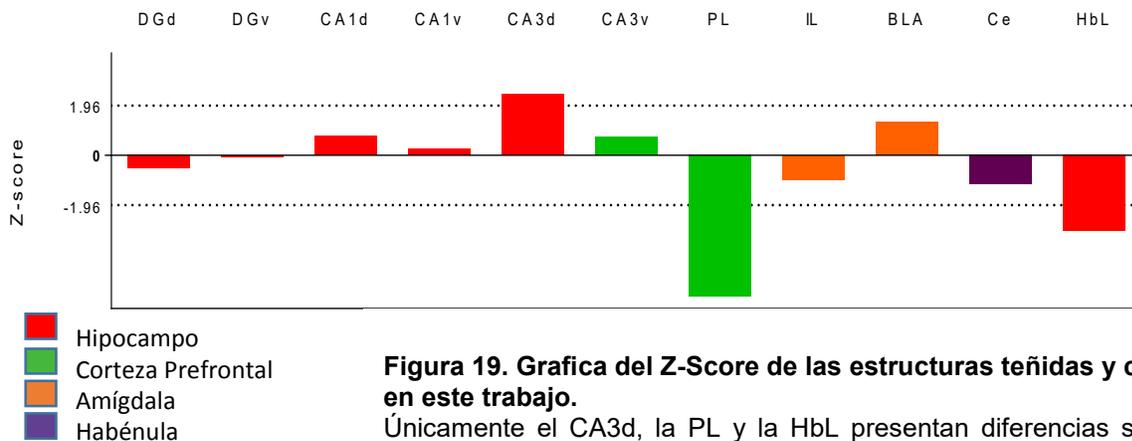


Figura 19. Grafica del Z-Score de las estructuras teñidas y contadas en este trabajo. Únicamente el CA3d, la PL y la HbL presentan diferencias significativas entre los grupos Control y Enriquecido. En el caso de CA3d el grupo Control tiene más c-Fos, contrario a lo que se observó en PL y en HbL.

de las diferencias de la expresión de c-Fos entre los grupos control y enriquecido, normalizado para todas las áreas. La longitud de la barra dice que tan grande es la diferencia en la expresión de c-Fos entre los grupos. Dada la fórmula con la que se obtuvo el Z-Score la línea punteada marca el umbral donde la diferencia entre los grupos es estadísticamente significativa (figura 19). Únicamente se activaron diferencialmente tres áreas del cerebro. Aumentó la actividad en la región CA3 dorsal y disminuyó en PL y en HbL.

A continuación, se presentan las gráficas del conteo de células c-Fos+ en cada una de las áreas significativas. Los datos obtenidos de los conteos de la cantidad

A **B** PL **C** HbL

Figura 19.1. Conteo de c-Fos por área. Solamente CA3 dorsal, PL y HbL exhibieron una activación diferencial significativa entre grupos. (A) CA3 dorsal estuvo más activa en el grupo enriquecido que en el grupo control. **(B)** La PL disminuyó su actividad en el grupo enriquecido igual que la HbL **(C)**. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.0001$

de células positivas a c-Fos en cada una de las regiones fueron analizados con una prueba de t, obteniendo significancia estadística solamente en la región CA3 dorsal del hipocampo, en la corteza prefrontal y en la Habénula. En la región de CA3 el resultado del estadístico fue $t_{19} = 2.41$ $p < 0.05$. En la región de la corteza prefrontal se obtuvo $t_{19} = 2.41$ $p < 0.0001$. Y, en la Habénula $t_{19} = 2.92$ $p < 0.01$.

El aumento de neurogénesis antes de la extinción no tiene efecto alguno sobre el regreso del miedo

A diferencia del protocolo anterior, en este en este caso el enriquecimiento ambiental fue proporcionado antes de la extinción. De modo que, al finalizar el condicionamiento los animales fueron separados en grupos. El condicionamiento (Figura 20 A) se adquirió correctamente y sin diferencias en ambos grupos ($F_{1, 14} = 0.02$ $p > 0.05$). Sin embargo, existe una diferencia clara entre el congelamiento de ambos grupos durante los 5 primeros minutos y el congelamiento de ambos grupos durante los últimos 5 minutos ($F_{1, 14} = 181.3$ $p < 0.0001$).

Tras un mes en enriquecimiento ambiental o en cajas sencillas, se llevó a cabo la extinción (figura 20 B). Cuando los animales fueron reexpuestos al contexto en el que condicionaron, la inmovilización estuvo en niveles cercanos al 70% al inicio de la extinción. No obstante, fue disminuyendo paulatinamente hasta llegar aproximadamente al 20%. Este cambio en los niveles de miedo fue analizado con una ANOVA de medidas repetidas (tiempo $F_{1, 14} = 14.47$ $p < 0.01$). Ambos grupos lograron extinguir el miedo al contexto igualmente bien, por lo que no se encontraron diferencias entre los grupos al analizar los datos conductuales con una ANOVA de medidas repetidas ($F_{1, 14} = 0.85$ $p > 0.05$).

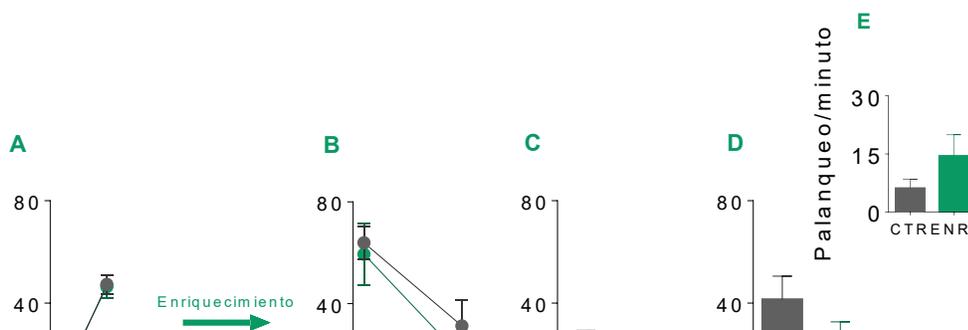


Figura 20. El enriquecimiento ambiental previo a la extinción no tiene efecto en la recuperación espontánea del miedo. (A) Ambos grupos condicionaron correctamente. (B) Tras 30 en enriquecimiento ambiental sucedió la extinción. Puede observarse como el congelamiento inicia en un punto alto y al finalizar la extinción está bastante bajo. (C) Los niveles en que los grupos muestran miedo durante la prueba 1 son similares a los alcanzados durante los últimos 5 minutos de la extinción. (D) En la prueba 2 ambos grupos muestran los mismos niveles de miedo, a pesar de que los controles parecen temer más. (E) Aunque pareciese que el enriquecido palanqueo más, no hay diferencias entre ambos grupos. Control n = 8 Enriquecido n = 8

Para saber si la extinción había sido adquirida correctamente, al día siguiente de la extinción se realizó la prueba 1 (figura 20 C), donde se expuso a los animales al contexto durante 10 minutos. Ambos grupos aprendieron a extinguir del mismo modo, exhibiendo niveles de miedo indistintos. Se analizaron las medias poblacionales con una prueba de t no pareada ($t_{14} = 0.18$ $p > 0.05$).

La prueba 2 ocurrió 24 horas después, del mismo modo que en la prueba anterior los animales fueron expuestos durante 10 minutos al contexto en el que fueron condicionados y un mes después extinguieron. Tanto el grupo control como el grupo enriquecido presentaron niveles de congelamiento y palanqueo similares. Las medias poblacionales fueron analizadas con una prueba de t (congelamiento t

$t_{14} = 1.35$ $p > 0.05$, palanqueo $t_{14} = 1.41$ $p > 0.05$). Es decir, ambos grupos mostraron los mismos niveles de conductas asociadas con el regreso del miedo.

El aumento de la neurogénesis antes de la extinción no tiene correlación con la expresión de conductas asociadas con miedo.

Para comprobar que el enriquecimiento ambiental tiene un efecto directo sobre la cantidad de neuronas inmaduras en el GD, se realizó inmunohistoquímica para localizar la proteína DCX y se cuantificaron las células positivas a ella. El enriquecimiento ambiental promovió la neurogénesis en el grupo enriquecido (figura 21 A). El grupo enriquecido mostró una cantidad mayor de células positivas a DCX que el grupo control ($t_{14} = 3.89$ $p < 0.01$).

También se realizaron correlaciones de la neurogénesis con la conducta. Los resultados arrojaron la inexistencia de correlaciones, por lo que se concluye que los niveles de neurogénesis no se relacionan con la expresión del miedo en este caso. La correlación de DCX+ con el palanqueo arrojó una ecuación $y = 0.04051x - 5.61$ y $p > 0.05$. Con un valor de $r^2 = 0.12$. De esto, podemos inferir que solamente el 12% del cambio observado en la conducta se debe a las células DCX+. Mientras que la correlación de DCX+ con el congelamiento muestra una ecuación $y = -0.08352x + 65.36$, una $r^2 = 0.12$ y $p > 0.05$.

En resumen, el enriquecimiento ambiental promovió la neurogénesis hipocampal en el grupo enriquecido. Sin embargo, este aumento de nuevas neuronas no tiene correlación con la conducta observada, si el EA sucede antes del aprendizaje de extinción.

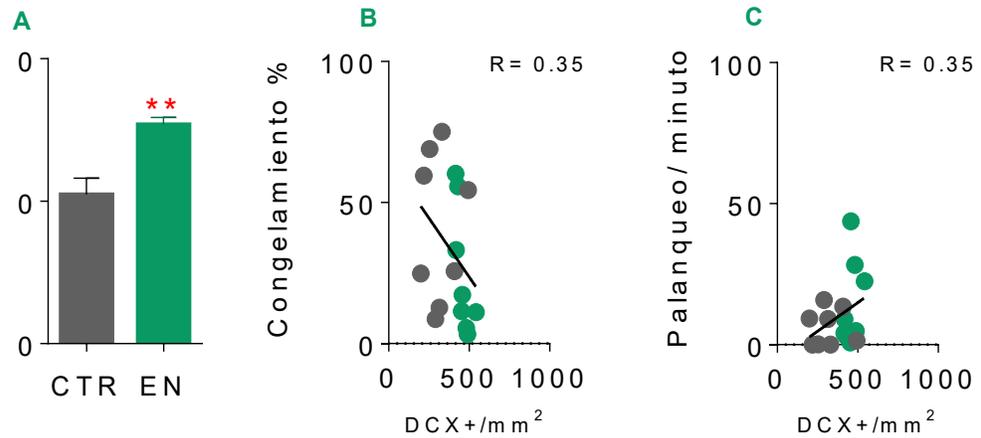


Figura 21. El grupo enriquecido presenta más DCX que el control y esta DCX se relaciona negativamente con el congelamiento y positivamente con el palanqueo. (A) Comparación de la cantidad de DCX/ mm² en ambos grupos. El grupo enriquecido tiene más DCX+ que el grupo control. **(B)** Diagrama de dispersión de la regresión lineal entre el congelamiento y la cantidad de DCX/mm² $p > 0.05$ **(C)** Diagrama de dispersión de la regresión lineal entre el palanqueo/minuto y la DCX/mm². La correlación no es significativa $p > 0.05$. Debido a que las correlaciones no son significativas no se puede decir que la conducta observada se pueda vincular al aumento de la neurogénesis. ** $p < 0.01$

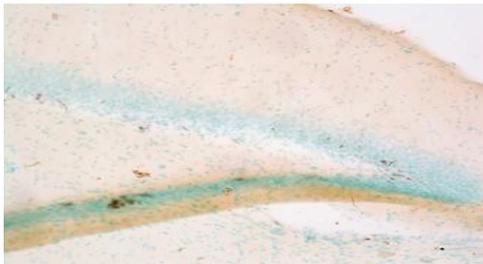


Figura 21.1 El grupo Enriquecido presenta más DCX que el Control. Fotografía superior. Animal que habitó en ambiente enriquecido (10x).
Fotografía inferior. Animal que habitó en una caja hogar control (10x).

En ausencia de extinción, el aumento de neurogénesis no tiene correlación con la expresión de conductas asociadas con miedo.

En este protocolo, se prescindió de la extinción de modo que la prueba 1 sucedió al día siguiente del condicionamiento. El condicionamiento (figura 22 A) se adquirió exitosamente en ambos grupos, sin diferencias entre ellos ($F_{1, 22} = 2.23$ $p > 0.05$). Solo hay diferencias entre los primeros y los últimos 5 minutos del condicionamiento de ambos grupos ($F_{1, 22} = 203.9$ $p < 0.0001$).

Al día siguiente, se proporcionó la prueba 1 (figura 23 B). Las ratas fueron introducidas en el contexto durante 10 minutos para probar si el miedo al contexto había sido bien adquirido. Tanto el grupo enriquecido como el grupo control exhibieron el mismo miedo, lo que indica que ambos grupos aprendieron a temer por igual ($t_{22} = 0.55$ $p > 0.05$).

Tras un mes de enriquecimiento ambiental o de sólo permanecer en las cajas hogar, se proporcionó la prueba 2 (figura 22 C). Los animales permanecieron 10 minutos en el contexto y se observó que ambos grupos presentaron los mismos niveles de miedo ($t_{22} = 0.49$ $p > 0.05$). En cuanto al palanqueo (figura 22 D) tampoco se encontraron diferencias en las medias de los grupos ($t_{22} = 0.09$ $p > 0.05$). Esto indica que, en ausencia de extinción, el enriquecimiento ambiental no promueve ningún efecto en el regreso del miedo.



Figura 22. El enriquecimiento ambiental en ausencia de extinción no tiene efecto en la recuperación espontánea del miedo. (A) Condicionamiento, promedio de los primeros y los últimos 5 minutos. **(B)** Prueba 1 ambos grupos se congelaron igual. Tras un mes de enriquecimiento ambiental se expuso a los animales al contexto aversivo una vez más en la prueba 2 **(C)** La inmovilización de ambos grupos es igual, es decir el enriquecimiento ambiental no tuvo efecto sobre el miedo. **(D)** En el palanqueo tampoco hay diferencias entre el grupo control y el enriquecido.

Sin extinción del miedo no hay recuperación espontánea ni efecto del enriquecimiento ambiental.

Se comparó el congelamiento de las dos pruebas para observar el cambio en la conducta de congelamiento. No se observó ningún cambio en los niveles de miedo entre los grupos ($F_{1, 22} = 0.39$ $p > 0.05$). Por lo tanto, no hubo recuperación espontánea del miedo, de hecho, el miedo permaneció en los mismos niveles antes y después del enriquecimiento ambiental (figura 23).

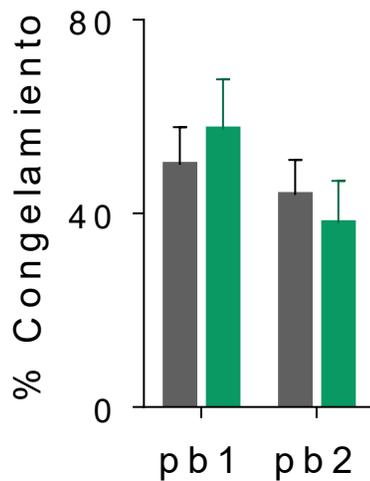


Figura 23. Sin extinción el miedo no hay recuperación espontánea ni efecto del enriquecimiento ambiental. Probablemente debido a que el miedo nunca fue extinto, ambos grupos muestran niveles de congelamiento altos durante ambas pruebas.

El efecto neurogénico del enriquecimiento ambiental es específico del GD.

Con el fin de determinar la especificidad en el GD del efecto neurogénico del enriquecimiento ambiental, se realizaron inmunotinciones para localizar y cuantificar la proteína DCX en la corteza orbitofrontal (COF) y en el GD. En la COF se pueden observar las neuronas inmaduras que migran por la vía rostral desde el ventrículo lateral hacia el bulbo olfatorio. Sin embargo, encontramos que los niveles de DCX en la COF eran indistintos entre el grupo enriquecido y el control ($t_{10} = 0.65$ $p > 0.05$). No así en el GD, donde el grupo enriquecido mostró un mayor nivel de células positivas a DCX ($t_{12} = 4.54$ $p < 0.001$). Estos resultados muestran que el enriquecimiento ambiental promueve la neurogénesis únicamente en el GD.

A

B

Figura 24. Los animales enriquecidos tienen más neurogénesis que los controles y éste efecto es específico del GD. (A) El grupo Enriquecido tiene significativamente más DCX, que se traduce en más neuronas inmaduras que el grupo Control (B) Conteo por sección de DCX en la corteza orbitofrontal. No hay diferencia significativa entre grupos. El efecto del enriquecimiento ambiental en el aumento de la neurogénesis es específico del GD. *** $p > 0.001$

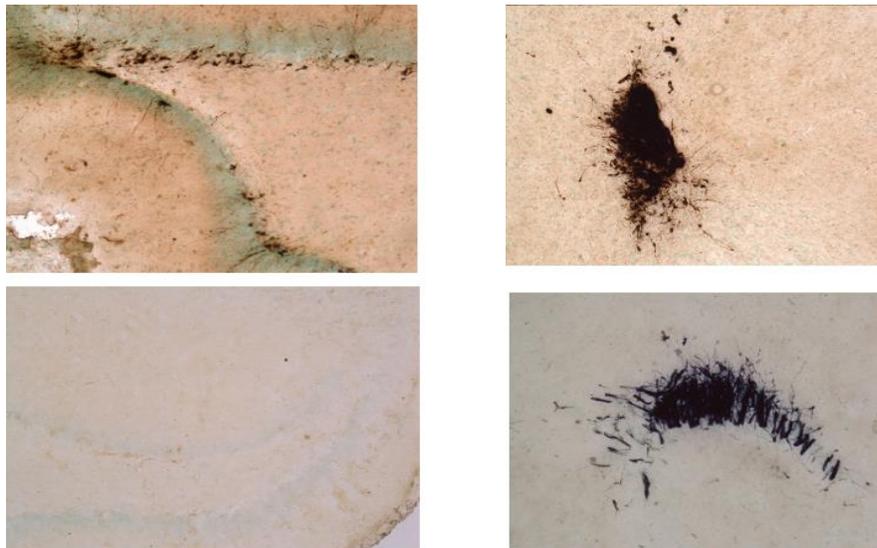


Figura 24.1 Los animales enriquecidos tienen más neurogénesis que los controles y este efecto es específico de GD. Fotografías superiores. (Izq.) GD de un animal que habitó en un ambiente enriquecido. (Der.) Corteza orbitofrontal de un animal que habitó en un ambiente enriquecido. Fotografías inferiores. (Izq.) GD de un animal que habitó en una caja hogar control (Der.) Corteza orbitofrontal de un animal que habitó en una caja hogar control.

El aumento de neurogénesis en ausencia de extinción no tiene correlación con la expresión de conductas asociadas con miedo.

Para saber si el aumento de neurogénesis en ausencia de extinción tuvo algún efecto sobre el regreso del miedo, se realizaron correlaciones entre la cantidad de neuronas positivas a DCX y la conducta, congelamiento y palanqueo (figura 25 A y B). La correlación de la neurogénesis con el congelamiento es muy baja, lo que está indicado por la ecuación $y = 0.04420x + 15.40$ y la $r^2 = 0.09$. La correlación del palanqueo y las células DCX+ es igualmente baja, con una $r^2 = 0.006$ y una ecuación $y = -0.003908x + 8.22$. Ambas correlaciones arrojaron una $p > 0.05$. De modo que el aumento de la neurogénesis antes de la extinción no tiene ningún efecto sobre la conducta en el regreso del miedo.

Resumiendo, comprobamos que el aumento de la complejidad en el ambiente promueve la neurogénesis. Y que esta generación de nuevas neuronas es específica del giro dentado. Encontramos también que, el aumento de la neurogénesis previene la recuperación del miedo condicionado únicamente si se proporciona tras la extinción.

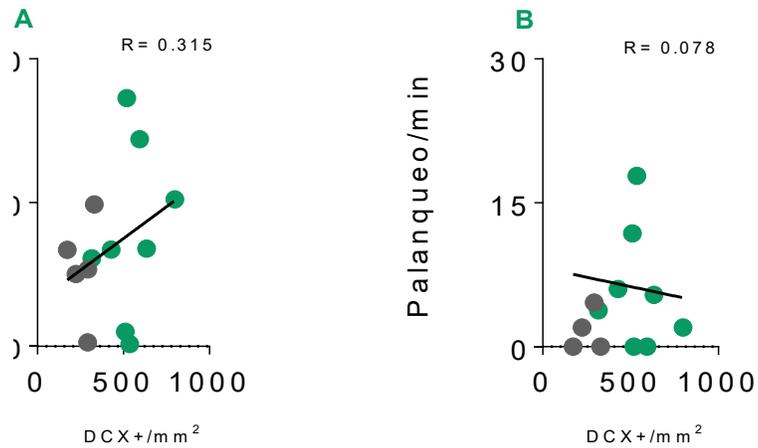


Figura 25. La neurogénesis no se relaciona con la conducta, en ausencia de extinción (A) Diagrama de dispersión entre DCX y congelamiento, no hay correlación. $p > 0.05$. **(B)** Diagrama de dispersión entre DCX+ y el palanqueo/ min, tampoco hay correlación. $p > 0.05$. Sin extinción la neurogénesis no tiene efecto alguno sobre la conducta de regreso del miedo.

Discusión

La extinción de un miedo condicionado al contexto y la recuperación espontánea del miedo contextual son fenómenos que dependen en gran medida del hipocampo y de la amígdala. Se ha visto que las nuevas neuronas generadas en el GD del hipocampo adulto pueden integrarse a los circuitos formados previamente. Hay evidencia que indica que modificar la cantidad de nuevas neuronas puede afectar la formación y la expresión del aprendizaje dependiente de hipocampo. Sin embargo, se desconocía si la adición de nuevas neuronas en los circuitos de memorias previas de condicionamiento al contexto y extinción afectaba el regreso del miedo contextual previamente extinto. Es por eso que en este trabajo decidimos contestar esa pregunta mediante tres experimentos. En estos experimentos, se enseñó a grupos de ratas a temer a un contexto. Posteriormente, se aumentó la neurogénesis hipocampal antes, después y en ausencia de extinción. La importancia de este diseño experimental recae en que puede aproximarse al fenómeno de la recuperación del miedo que sucede en humanos.

El regreso del miedo es uno de los problemas más serios de las terapias de exposición (extinción), que son la base de los tratamientos de desórdenes de miedo, traumas o ansiedad en humanos (Vervliet, Craske et al. 2013). Este problema es grave, ya que se reporta que de todos los pacientes que se someten a terapias de exposición tras una experiencia traumática, entre un 19% a un 62% sufren regreso del miedo (Craske, Treanor et al. 2014). Nosotros encontramos que aumentar la neurogénesis hipocampal únicamente después, pero no antes, de la extinción evita el regreso del miedo.

El enriquecimiento ambiental aumenta la neurogénesis hipocampal y proporcionado tras la extinción evita el regreso del miedo.

En el primer experimento, donde se aumentó la neurogénesis hipocampal después del aprendizaje de extinción, encontramos que el grupo que vivió en enriquecimiento ambiental no mostró recuperación espontánea del miedo condicionado, en comparación con el grupo control. Ambos grupos aprendieron a extinguir en igual medida, por lo que se descarta un aprendizaje deficiente como la causa del miedo diferencial mostrado en la prueba. Un mes después de haber sido sometidos a enriquecimiento ambiental, se observa que el grupo enriquecido no presenta recuperación espontánea del miedo, manifestado en un bajo porcentaje de congelamiento y un palanqueo significativamente diferente al del grupo control.

El enriquecimiento ambiental tras la extinción del miedo promovió que el miedo no regresara. Se ha demostrado que uno de los moduladores de la neurogénesis hipocampal es el aprendizaje hipocampal mismo. En un ambiente enriquecido se brindan oportunidades constantes de aprendizaje (Gould, Tanapat et al. 1999). Se eligió aumentar el enriquecimiento ambiental y en específico, el ejercicio aeróbico como estrategia para aumentar la neurogénesis hipocampal ya que ha sido ampliamente comprobado su efecto sobre el aumento de las nuevas neuronas (van Praag, Kempermann et al. 1999, Kobil, Liu et al. 2011). Sin embargo, la neurogénesis hipocampal es una consecuencia del enriquecimiento ambiental, entre muchas otras.

El enriquecimiento ambiental tiene efectos a diferentes niveles, por ejemplo, morfológicos, plásticos, moleculares y conductuales. De hecho, se ha comprobado

que el ambiente enriquecido en conjunto con el ejercicio aeróbico (correr) promueven la neurogénesis, la gliogénesis, la sinaptogénesis y la angiogénesis (Isaacs, Anderson et al. 1992). Además, la potenciación a largo plazo (LTP) es más estable en animales expuestos a ambientes enriquecidos que en aquellos criados en condiciones control (van Praag, Christie et al. 1999). Molecularmente, la exposición a un ambiente enriquecido incrementa la expresión de factor de crecimiento nervioso (NGF) (Mohammed, Henriksson et al. 1993), de factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF) (Falkenberg, Mohammed et al. 1992) y de factor neurotrópico derivado de la glía (GDNF) (Young, Lawlor et al. 1999). De hecho, se ha sugerido que la actividad de algunos de estos factores está relacionada con el aprendizaje y la plasticidad sináptica, en particular NGF y BDNF (Fischer, Wictorin et al. 1987, Kang and Schuman 1995).

De modo que los efectos encontrados no pueden ser circunscritos únicamente a un efecto de la neurogénesis, sino a un efecto del enriquecimiento ambiental y de la neurogénesis hipocampal en conjunto.

El aumento en la neurogénesis se relaciona con la disminución de miedo

Era necesario saber si el enriquecimiento ambiental que estábamos proporcionando en realidad provocaba el aumento de la neurogénesis hipocampal. Para saber esto, hicimos inmunohistoquímica para localizar la proteína DCX. De acuerdo con lo esperado, encontramos que el grupo enriquecido tenía una cantidad mayor de células inmaduras que el grupo control. Al correlacionar estos resultados con la conducta encontramos que mientras más neurogénesis tuvieran los animales, menor congelamiento y mayor palanqueo habían presentado. Sugiriendo

que, aumentar la cantidad de nuevas neuronas puede evitar la recuperación de la memoria de miedo, si esto sucede después de la extinción.

Existen modelos computacionales que predicen que agregar más neuronas al sistema provoca la desestabilización de los circuitos formados con anterioridad (Weisz and Argibay 2012). Sin embargo, esto se encontró experimentalmente, en un trabajo donde el aumento de la neurogénesis tras el entrenamiento promovía el olvido de memorias hipocampo dependientes adquiridas con anterioridad (Akers, Martinez-Canabal et al. 2014). Esto sugiere que el aumento de la neurogénesis puede estar impactando al hipocampo en la formación y expresión de la memoria y aprendizaje de dos modos. Primero, agregar nuevas neuronas puede ayudar a hacer de lado memorias viejas y segundo, esto puede facilitar la codificación de información nueva (Frankland, Kohler et al. 2013). De hecho, se ha observado que el aumentar la neurogénesis hipocampal tras la adquisición de dos memorias correspondientes a dos tareas dependientes de hipocampo diferentes, se promueve que la interferencia entre estas memorias se reduzca (Epp, Silva Mera et al. 2016). Es decir, que se separen sus trazos en el hipocampo y que ambas tengan circuitos completamente independientes.

Nosotros pudimos haber visto este suceso, ya que la extinción y el regreso del miedo están íntimamente relacionadas por ser hipocampo dependiente y estar ligados al contexto. Entonces podría ser que, al aumentar las nuevas neuronas que disminuyen la interferencia entre memorias (Epp, Silva Mera et al. 2016), las memorias previas de condicionamiento y extinción se separen y prevalezca la extinción.

Las nuevas neuronas tienen un momento en su desarrollo, donde son altamente capaces de establecer sinapsis, incluso con mayor facilidad que las células maduras (Deng, Aimone et al. 2010). Como observamos mediante las tinciones DCX el grupo enriquecido tenía una cantidad mayor de neuronas inmaduras, por lo que su actividad debería verse reflejada en la actividad de algunas otras estructuras involucradas en el control de la conducta de miedo y extinción.

Activación diferencial en hipocampo, corteza prefrontal y habénula.

Se realizó inmunohistoquímica para localizar la proteína c-Fos, para saber que regiones del cerebro relacionadas con los circuitos de miedo y extinción se activaron. Encontramos únicamente que tres regiones presentaron una activación diferencial: el área CA3 del hipocampo dorsal, la PL y la HbL. El grupo enriquecido presentó un aumento en la actividad de CA3 dorsal, mientras que mostró disminución en la actividad de la PL y la HbL.

CA3 dorsal es una parte importante del hipocampo ya que mucha de la información que entra a CA3 viene de las fibras musgosas del GD, que es justo la zona donde nacen las nuevas neuronas. Una gran parte de la información que ingresa al hipocampo tiene que pasar por el GD y luego por CA3 (Witter, Naber et al. 2000) Aunque también hay entradas importantes desde la corteza entorrinal hacia CA1 y CA3 directamente, De modo que, CA3 se conecta con CA1 y consigo mismo. Probablemente la adición de nuevas neuronas está causando un reajuste en la plasticidad del circuito trisináptico, que se expresa en una mayor cantidad de células c-Fos+ en CA3.

Las diferencias encontradas en la PL, tienen sentido respecto a la conectividad de la PL con la amígdala. En algunos trabajos se ha observado que la inactivación de PL afecta la expresión del miedo condicionado a un tono, pero no tienen efecto alguno sobre los temores innatos o la plasticidad de la memoria del condicionamiento o la extinción (Corcoran and Quirk 2007). La PL es necesaria para la expresión del miedo, se conecta con BLA y esta con Ce, que es el área ejecutora de señales para expresar el miedo (Sotres-Bayon and Quirk 2010). Recientemente, mediante el uso de optogenética, se describió una ruta unidireccional desde la corteza prefrontal hacia el hipocampo, más específicamente hacia CA3 y CA1 (Rajasehupathy, Sankaran et al. 2015). Entonces, puede ser que la activación diferencial que se encontró en CA3 dorsal sea un reflejo de la relación interestructural que sucede en el grupo enriquecido. Ya que en este grupo la actividad de la corteza PL disminuyó significativamente mientras que la de CA3 dorsal, aumentó.

El patrón de actividad de estas dos áreas nos puede estar dando la clave del funcionamiento del circuito responsable de la conducta obtenida. Ya que, nuestra manipulación en la neurogénesis logró que la memoria de extinción prevalezca sobre la de miedo. Sin embargo, no sabemos qué implicaciones tiene esto a nivel de circuitos entre diferentes áreas y regiones. La actividad mostrada por PL y por CA3, parece estar hablando de un circuito que puede regular las respuestas de miedo mediante relaciones inhibitorias entre CA3dorsal y PL.

En cuanto a HbL, a pesar de ser una estructura altamente conservada entre los vertebrados, está bastante inexplorada. Sin embargo, se menciona que la habénula reacciona ante situaciones donde se presenten estímulos aversivos. De

hecho, el estrés activa a la habénula y esta activación se restringe a la parte medial (Hikosaka 2010). Se sabe que el enriquecimiento ambiental disminuye los niveles de estrés en los animales, además de que la HbL carece de conexión directa con el hipocampo, aspectos que podrían estar explicando la disminución en la actividad de la HbL en el grupo enriquecido.

En resumen, encontramos que el enriquecimiento ambiental promueve el aumento en la generación de nuevas neuronas en el GD. Y que estas nuevas neuronas podrían ser capaces de afectar la recuperación espontánea del miedo. Correlaciones entre la conducta y la cantidad de DCX+ mediante afectar la actividad de diversas estructuras como, la PL, CA3 dorsal y la HbL. La interacción entre estas estructuras puede modular la conducta y evitar que el miedo regrese, si sucede después de la extinción. No obstante, para poder aclarar mejor la situación temporal en que deben suceder la extinción y la neurogénesis fue necesario hacer otro experimento.

[El aumento de neurogénesis antes de la extinción no tiene efecto alguno sobre el regreso del miedo](#)

Para saber si el aumento de la neurogénesis podía evitar el regreso del miedo, independientemente de la existencia de una memoria de extinción previa, se sometió a un grupo de ratas a enriquecimiento ambiental inmediatamente después del condicionamiento. Tras el enriquecimiento ambiental los animales fueron probados. Encontramos que, el enriquecimiento ambiental antes de la extinción no evita la recuperación espontánea del miedo contextual.

Estos resultados implican que para ver un efecto conductual producto de la neurogénesis, tendría que haber memorias previamente formadas. Ha sido repetidamente mencionado en la literatura que, el aumento de la neurogénesis facilita el aprendizaje de algunas tareas dependientes de hipocampo. En un experimento, se entrenó a ratones en un laberinto acuático de Morris, tras lo cual se exacerbó la neurogénesis hipocampal y se cambió la ubicación de la plataforma. Se observó que solamente los animales con la neurogénesis hipocampal aumentada, lograron encontrar la nueva ubicación de la plataforma (Akers, Martinez-Canabal et al. 2014). Dado que en nuestro experimento la extinción sucedió tras el aumento de la neurogénesis, pudo ser que estuviésemos viendo la facilitación del aprendizaje de extinción debido a las nuevas neuronas. Sin embargo, en la prueba 2 el congelamiento no es diferente entre los grupos, aunque se observa una tendencia

En nuestro experimento, la extinción sucedió después del aumento de la neurogénesis. Podría ser que estuviéramos viendo la facilitación del aprendizaje hipocampal. Sin embargo, esto no es del todo claro ya que no hay diferencias en el miedo, entre grupos. Por lo que se requieren más experimentos o aumentar la n en este experimento

[El enriquecimiento ambiental antes de la extinción no evita que el miedo regrese](#)

Al comparar la conducta de ambas pruebas, observamos una tendencia del grupo control a recuperar el miedo en la prueba 2. Mientras que el grupo enriquecido permanece igualmente bajo en ambas pruebas. Una probable explicación a la conducta del grupo enriquecido radica en el hecho de que la neurogénesis

promueve algunos tipos de aprendizaje hipocampal (Kee, Teixeira et al. 2007, Tashiro, Makino et al. 2007, Deng, Saxe et al. 2009). En este experimento se enseña que un lugar es peligroso, posteriormente la regla cambia y este lugar es seguro.

Entonces lo observado en este experimento podría estar explicado por una facilitación del nuevo aprendizaje causada por la neurogénesis. No obstante, los resultados no son significativos por lo que es necesario aumentar el número de animales en los grupos o realizar nuevos experimentos para aclarar lo observado.

[El aumento de la neurogénesis antes de la extinción no tiene correlación con la expresión de conductas asociadas con miedo.](#)

El grupo enriquecido presentó una cantidad mayor de células inmaduras que el grupo control. A pesar de ello, no hay correlación entre el número de neuronas nuevas y la conducta. Por lo que los resultados conductuales de este experimento no pueden ser explicados usando la neurogénesis.

Según el modelo de Weisz (2009, 2012) la adición de nuevas neuronas puede desestabilizar el circuito neural donde se sustentan las memorias hipocampales viejas. Podríamos estar viendo una forma de desestabilización de la memoria de condicionamiento. Lo que explicaría únicamente porque el grupo enriquecido no tuvo miedo, más no puede explicar al grupo control.

Otra idea que tiene como apoyo la emitida por Weisz sobre la función de las nuevas neuronas indica que, el aumento de la neurogénesis hipocampal promueve el olvido facilitando la plasticidad de la memoria (Akers, Martinez-Canabal et al. 2014). El hipocampo es una estructura que debe de codificar mucha información y muy rápidamente, de modo que el proceso de degradación de información puede resultar de utilidad. Se propone que esto sucede mediante la reconfiguración de los

circuitos de GD-CA3. Al ser modificados los circuitos que sustentan una memoria, está no puede expresarse íntegramente porque el patrón neural subyacente a ella ha sido modificado por las nuevas neuronas (Treves and Rolls 1994, Akers, Martinez-Canabal et al. 2014). Esta explicación es plausible solo para el grupo enriquecido.

Como se mencionó anteriormente, son necesarios más experimentos como este para limpiar la confusión causada por la tendencia del grupo control a aumentar el congelamiento en la prueba 2. De modo que, hasta este punto, el aumento de la neurogénesis hipocampal antes de la extinción no evita la recuperación espontánea del miedo condicionado. El siguiente paso en la línea lógica planteada era quitar la extinción, para averiguar si el aumento de la neurogénesis por sí solo tenía algún efecto en la recuperación del miedo.

[El aumento de la neurogénesis en ausencia de la extinción no tiene correlación con la expresión de conductas asociadas con miedo.](#)

Para saber si el efecto que observamos en el experimento era dependiente de la memoria de extinción, se realizó un experimento más, esta vez en ausencia de extinción. Tras pasar un mes en un ambiente enriquecido o en cajas hogar convencionales, se probó el regreso del miedo. No encontramos diferencias en la conducta mostrada por ninguno de los grupos.

Una posible explicación a este fenómeno era que la forma en que estábamos promoviendo el aumento de neurogénesis hipocampal no estuviera actuando como creíamos. Por ejemplo, que estuviéramos teniendo un efecto inespecífico del enriquecimiento ambiental, ya que se sabe existe neurogénesis en la zona

subventricular del bulbo olfatorio. Por ello se realizaron inmunotinciones contra DCX en el GD y en la COF que es parte de la ruta migratoria de estas células hacia el bulbo olfatorio. Observamos que ambos grupos expresaron la misma cantidad de neuronas nuevas en la COF, no así en el GD. Entonces concluimos que el enriquecimiento ambiental promueve la neurogénesis específicamente en el GD. Sin embargo, en ausencia de extinción la cantidad de nuevas neuronas no se relaciona con la conducta.

Se observa que el miedo permaneció prácticamente en el mismo nivel desde el condicionamiento en ambos grupos. Tras el mes de enriquecimiento ambiental el miedo estaba prácticamente igual que tras el condicionamiento. Esto podría ser explicado por el hecho de que la memoria de miedo jamás fue suprimida por ninguna memoria de extinción. De modo que al promover la alteración de circuitos con la adición de nuevas neuronas no hubo otro circuito previo que el del miedo contextual.

Entonces, el aumento de la neurogénesis hipocampal evita el regreso del miedo condicionado a un contexto, únicamente si sucede tras la extinción. Lo que implica que, es necesaria la existencia previa de las memorias tanto de miedo como de extinción para que el efecto que ejercen las nuevas neuronas favorezca que el miedo no regrese. Mediante correlaciones de c-Fos con la expresión conductual del miedo y las diferentes áreas activadas, obtuvimos un mapa de la actividad neuronal entre las áreas que integran el circuito subyacente a la conducta de no recuperación espontánea del miedo. Las nuevas neuronas del GD se conectan con CA3 promoviendo su excitación. Mediante relaciones con algunas otras estructuras logran la inhibición de la PL, que inhibe a la HbL, lo que promueve la prevalencia de la memoria de extinción sobre la del miedo.

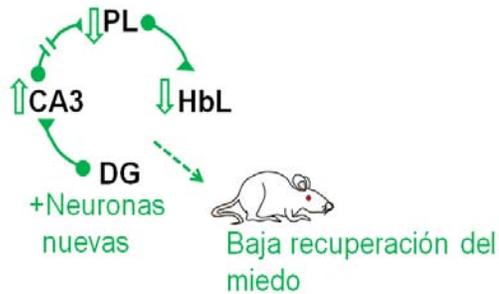


Figura 26. Relaciones de actividad entre las estructuras que pueden conformar el circuito del no regreso del miedo. El aumento de neuronas inmaduras en el GD promueve la actividad de CA3, que mediante otras estructuras inhibe a PL. Esto provoca que la HbL se inhiba, provocando una baja recuperación del miedo.

La ablación de la neurogénesis combinada con el enriquecimiento ambiental tras la extinción no previene el regreso del miedo

Con el fin de determinar si la neurogénesis era la responsable del efecto observado en este y otros trabajos, Sofía López Oropeza realizó un experimento donde se proporcionaron el condicionamiento, la extinción y la prueba 1 exactamente igual a las previamente descritas, con la diferencia de que al día siguiente de la prueba 1 algunos animales fueron sometidos a un protocolo de ablación de la neurogénesis. La ablación de la neurogénesis se llevó a cabo mediante exposición focalizada a rayos X. De manera simultánea, todos los animales, sin importar si fueron radiados o no se instalaron en cajas hogar enriquecidas. Tras un mes bajo estas condiciones, los animales fueron probados. Se observó que el grupo cuya neurogénesis había sido suprimida tenía niveles de miedo mucho más altos que el control. Esto indica que gran parte del efecto observado en la prevención del regreso del miedo contextual se debe a las nuevas neuronas.

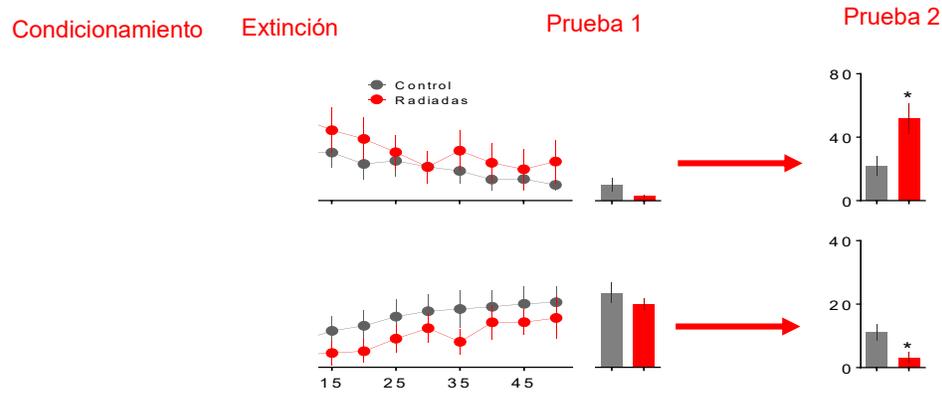


Figura 27 La ablación de la neurogénesis a pesar del enriquecimiento ambiental, no evita el regreso del miedo. Tras el condicionamiento contextual, la extinción y la prueba 1, un grupo de animales fue radiado con rayos X para eliminar la neurogénesis mientras era expuesto a un ambiente enriquecido. Tras un mes los grupos se probaron en el mismo contexto. Sin embargo, el grupo radiado tuvo más miedo que el grupo control a pesar de haber vivido en un ambiente enriquecido. Inmovilización ($t_{14} = 2.79$ $p < 0.05$) palanqueo ($t_{14} = 2.2$ $p < 0.05$).

Perspectivas futuras

Nuestros resultados muestran que es posible evitar el regreso del miedo condicionado, con una estrategia que combine un tratamiento de extinción y el aumento de la neurogénesis hipocampal. No obstante, hacen falta más experimentos para dilucidar que el efecto obtenido se debe a la prevalencia de la extinción, provocada por la alteración de la neurogénesis en los circuitos previos y no a una prevalencia de la memoria más reciente. Esto puede ser contestado realizando los mismos experimentos, pero intercambiando el orden del condicionamiento y la extinción. Así se podrá dilucidar si es realmente la extinción la que tiende a prevalecer si se combina con la neurogénesis.

En la realización de este trabajo hemos mostrado que nuestro hallazgo podría ser el punto de inicio de más estudios sobre terapias de exposición y neurogénesis, que en un futuro permitan que cada vez menos personas sufran por problemas como el trastorno de estrés postraumático. Además de profundizar en el conocimiento tan contradictorio sobre la función de las nuevas neuronas en el hipocampo adulto.

Conclusión

En este trabajo hemos demostrado que la neurogénesis hipocampal modifica los niveles de recuperación del miedo contextual, únicamente si la manipulación en la neurogénesis sucede después y no antes de la extinción. También hemos demostrado que este efecto es dependiente de la memoria de extinción y que es inexistente sin la memoria de extinción previamente formada.

Nuestros resultados sugieren que el aumento de la neurogénesis hipocampal puede lograr que prevalezca la memoria de extinción por sobre la de miedo contextual, mediante el reclutamiento de áreas cerebrales importantes en las respuestas de miedo.

En conjunto nuestros resultados indican que las nuevas neuronas del hipocampo regulan la recuperación del miedo, mediante la remodelación de la actividad en el circuito que controla la regulación de las respuestas del miedo.

Referencias Bibliográficas

Akers, K. G., A. Martinez-Canabal, L. Restivo, A. P. Yiu, A. De Cristofaro, H. L. Hsiang, A. L. Wheeler, A. Guskjolen, Y. Niibori, H. Shoji, K. Ohira, B. A. Richards, T. Miyakawa, S. A. Josselyn and P. W. Frankland (2014). "Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy." Science **344**(6184): 598-602.

Altman, J. and G. D. Das (1965). "Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats." J Comp Neurol **124**(3): 319-335.

Alvarez-Buylla, A., B. Seri and F. Doetsch (2002). "Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain." Brain Res Bull **57**(6): 751-758.

Ambrogini, P., D. Lattanzi, S. Ciuffoli, D. Agostini, L. Bertini, V. Stocchi, S. Santi and R. Cuppini (2004). "Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus." Brain Res **1017**(1-2): 21-31.

Arruda-Carvalho, M., M. Sakaguchi, K. G. Akers, S. A. Josselyn and P. W. Frankland (2011). "Posttraining ablation of adult-generated neurons degrades previously acquired memories." J Neurosci **31**(42): 15113-15127.

Bannister, N. J. and A. U. Larkman (1995). "Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: II. Spine distributions." J Comp Neurol **360**(1): 161-171.

Biebl, M., C. M. Cooper, J. Winkler and H. G. Kuhn (2000). "Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain." Neurosci Lett **291**(1): 17-20.

Bouton, M. E. (1988). "Context and ambiguity in the extinction of emotional learning: implications for exposure therapy." Behav Res Ther **26**(2): 137-149.

Bouton, M. E. (2002). "Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction." Biol Psychiatry **52**(10): 976-986.

Bouton, M. E. (2004). "Context and behavioral processes in extinction." Learn Mem **11**(5): 485-494.

Bouton, M. E. and R. C. Bolles (1979). "Role of conditioned contextual stimuli in reinstatement of extinguished fear." J Exp Psychol Anim Behav Process **5**(4): 368-378.

Bouton, M. E. and J. B. Nelson (1994). "Context-specificity of target versus feature inhibition in a feature-negative discrimination." J Exp Psychol Anim Behav Process **20**(1): 51-65.

Brown, J. P., S. Couillard-Despres, C. M. Cooper-Kuhn, J. Winkler, L. Aigner and H. G. Kuhn (2003). "Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis." J Comp Neurol **467**(1): 1-10.

Burgos-Robles, A., I. Vidal-Gonzalez and G. J. Quirk (2009). "Sustained conditioned responses in prelimbic prefrontal neurons are correlated with fear expression and extinction failure." J Neurosci **29**(26): 8474-8482.

Canteras, N. S. and L. W. Swanson (1992). "Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat." J Comp Neurol **324**(2): 180-194.

Corcoran, K. A. and G. J. Quirk (2007). "Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears." J Neurosci **27**(4): 840-844.

Craske, M. G., M. Treanor, C. C. Conway, T. Zbozinek and B. Vervliet (2014). "Maximizing exposure therapy: an inhibitory learning approach." Behav Res Ther **58**: 10-23.

Dafny, N. and J. T. Qiao (1990). "Habenular neuron responses to noxious input are modified by dorsal raphe stimulation." Neurol Res **12**(2): 117-121.

Darwin, C. (1872). The expression of the emotions in man and animals. London, John Murray.

Davis, M. (1992). "The role of the amygdala in fear and anxiety." Annu Rev Neurosci **15**: 353-375.

Davis, M. and P. J. Whalen (2001). "The amygdala: vigilance and emotion." Mol Psychiatry **6**(1): 13-34.

DeFelipe, J. and I. Farinas (1992). "The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs." Prog Neurobiol **39**(6): 563-607.

Deng, W., J. B. Aimone and F. H. Gage (2010). "New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?" Nat Rev Neurosci **11**(5): 339-350.

Deng, W., M. D. Saxe, I. S. Gallina and F. H. Gage (2009). "Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain." J Neurosci **29**(43): 13532-13542.

des Portes, V., J. M. Pinard, P. Billuart, M. C. Vinet, A. Koulakoff, A. Carrie, A. Gelot, E. Dupuis, J. Motte, Y. Berwald-Netter, M. Catala, A. Kahn, C. Beldjord and J. Chelly (1998). "A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome." Cell **92**(1): 51-61.

Doetsch, F., I. Caille, D. A. Lim, J. M. Garcia-Verdugo and A. Alvarez-Buylla (1999). "Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain." Cell **97**(6): 703-716.

Duan, X., E. Kang, C. Y. Liu, G. L. Ming and H. Song (2008). "Development of neural stem cell in the adult brain." Curr Opin Neurobiol **18**(1): 108-115.

Ehrlich, I., Y. Humeau, F. Grenier, S. Ciochi, C. Herry and A. Luthi (2009). "Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory." Neuron **62**(6): 757-771.

Eichenbaum, H. and N. J. Cohen (2014). "Can we reconcile the declarative memory and spatial navigation views on hippocampal function?" Neuron **83**(4): 764-770.

Epp, J. R., R. Silva Mera, S. Kohler, S. A. Josselyn and P. W. Frankland (2016). "Neurogenesis-mediated forgetting minimizes proactive interference." Nat Commun **7**: 10838.

Esposito, M. S., V. C. Piatti, D. A. Laplagne, N. A. Morgenstern, C. C. Ferrari, F. J. Pitossi and A. F. Schinder (2005). "Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development." J Neurosci **25**(44): 10074-10086.

Faber, E. S., R. J. Callister and P. Sah (2001). "Morphological and electrophysiological properties of principal neurons in the rat lateral amygdala in vitro." J Neurophysiol **85**(2): 714-723.

Falkenberg, T., A. K. Mohammed, B. Henriksson, H. Persson, B. Winblad and N. Lindefors (1992). "Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment." Neurosci Lett **138**(1): 153-156.

Fanselow, M. S. (1994). "Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear." Psychon Bull Rev **1**(4): 429-438.

Fendt, M. and M. S. Fanselow (1999). "The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear." Neurosci Biobehav Rev **23**(5): 743-760.

Fischer, W., K. Wictorin, A. Bjorklund, L. R. Williams, S. Varon and F. H. Gage (1987). "Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor." Nature **329**(6134): 65-68.

Francis, F., A. Koulakoff, D. Boucher, P. Chafey, B. Schaar, M. C. Vinet, G. Friocourt, N. McDonnell, O. Reiner, A. Kahn, S. K. McConnell, Y. Berwald-Netter, P. Denoulet and J. Chelly (1999).

"Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons." Neuron **23**(2): 247-256.

Frankland, P. W., S. Kohler and S. A. Josselyn (2013). "Hippocampal neurogenesis and forgetting." Trends Neurosci **36**(9): 497-503.

Gabbott, P. L., T. A. Warner, P. R. Jays, P. Salway and S. J. Busby (2005). "Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers." J Comp Neurol **492**(2): 145-177.

Gage, F. H. (2000). "Mammalian neural stem cells." Science **287**(5457): 1433-1438.

Goode, T. D. and S. Maren (2014). "Animal models of fear relapse." ILAR J **55**(2): 246-258.

Gould, E., A. Beylin, P. Tanapat, A. Reeves and T. J. Shors (1999). "Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation." Nat Neurosci **2**(3): 260-265.

Gould, E. and P. Tanapat (1999). "Stress and hippocampal neurogenesis." Biol Psychiatry **46**(11): 1472-1479.

Gould, E., P. Tanapat, N. B. Hastings and T. J. Shors (1999). "Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning." Trends Cogn Sci **3**(5): 186-192.

Guglielmotti, V. and L. Cristino (2006). "The interplay between the pineal complex and the habenular nuclei in lower vertebrates in the context of the evolution of cerebral asymmetry." Brain Res Bull **69**(5): 475-488.

Hastings, N. B. and E. Gould (1999). "Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells." J Comp Neurol **413**(1): 146-154.

Herdegen, T., K. Kovary, A. Buhl, R. Bravo, M. Zimmermann and P. Gass (1995). "Basal expression of the inducible transcription factors c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB, and Krox-24 in the adult rat brain." J Comp Neurol **354**(1): 39-56.

Herkenham, M. and W. J. Nauta (1977). "Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem." J Comp Neurol **173**(1): 123-146.

Herry, C., S. Ciocchi, V. Senn, L. Demmou, C. Muller and A. Luthi (2008). "Switching on and off fear by distinct neuronal circuits." Nature **454**(7204): 600-606.

Hikosaka, O. (2010). "The habenula: from stress evasion to value-based decision-making." Nat Rev Neurosci **11**(7): 503-513.

Hornung, J. P. (2003). "The human raphe nuclei and the serotonergic system." J Chem Neuroanat **26**(4): 331-343.

Hosseini-Sharifabad, M. and J. R. Nyengaard (2007). "Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus." J Neurosci Methods **162**(1-2): 206-214.

Isaacs, K. R., B. J. Anderson, A. A. Alcantara, J. E. Black and W. T. Greenough (1992). "Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning." J Cereb Blood Flow Metab **12**(1): 110-119.

Kang, H. and E. M. Schuman (1995). "Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus." Science **267**(5204): 1658-1662.

Kaplan, M. S. and J. W. Hinds (1977). "Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs." Science **197**(4308): 1092-1094.

Kee, N., C. M. Teixeira, A. H. Wang and P. W. Frankland (2007). "Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus." Nat Neurosci **10**(3): 355-362.

Kempermann, G., D. Gast, G. Kronenberg, M. Yamaguchi and F. H. Gage (2003). "Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice." Development **130**(2): 391-399.

Kempermann, G., S. Jessberger, B. Steiner and G. Kronenberg (2004). "Milestones of neuronal development in the adult hippocampus." Trends Neurosci **27**(8): 447-452.

Kempermann, G., H. G. Kuhn and F. H. Gage (1997). "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment." Nature **386**(6624): 493-495.

Knapaska, E. and S. Maren (2009). "Reciprocal patterns of c-Fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala after extinction and renewal of conditioned fear." Learn Mem **16**(8): 486-493.

Kobilo, T., Q. R. Liu, K. Gandhi, M. Mughal, Y. Shaham and H. van Praag (2011). "Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment." Learn Mem **18**(9): 605-609.

Lagace, D. C., M. C. Whitman, M. A. Noonan, J. L. Ables, N. A. DeCarolis, A. A. Arguello, M. H. Donovan, S. J. Fischer, L. A. Farnbauch, R. D. Beech, R. J. DiLeone, C. A. Greer, C. D. Mandyam and A. J. Eisch (2007). "Dynamic contribution of nestin-expressing stem cells to adult neurogenesis." J Neurosci **27**(46): 12623-12629.

Laurent, V. and R. F. Westbrook (2009). "Inactivation of the infralimbic but not the prelimbic cortex impairs consolidation and retrieval of fear extinction." Learn Mem **16**(9): 520-529.

LeDoux, J. E. (1995). "Emotion: clues from the brain." Annu Rev Psychol **46**: 209-235.

LeDoux, J. E. (2000). "Emotion circuits in the brain." Annu Rev Neurosci **23**: 155-184.

Leranth, C. and T. Hajszan (2007). "Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus." Prog Brain Res **163**: 63-84.

Likhtik, E., D. Popa, J. Apergis-Schoute, G. A. Fidacaro and D. Pare (2008). "Amygdala intercalated neurons are required for expression of fear extinction." Nature **454**(7204): 642-645.

Maren, S. (2001). "Neurobiology of Pavlovian fear conditioning." Annu Rev Neurosci **24**: 897-931.

Maren, S. (2005). "Building and burying fear memories in the brain." Neuroscientist **11**(1): 89-99.

Maren, S. (2014). "Fear of the unexpected: hippocampus mediates novelty-induced return of extinguished fear in rats." Neurobiol Learn Mem **108**: 88-95.

Maren, S. and M. S. Fanselow (1996). "The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked?" Neuron **16**(2): 237-240.

Maren, S. and G. J. Quirk (2004). "Neuronal signalling of fear memory." Nat Rev Neurosci **5**(11): 844-852.

Martinez Canabal, A. (2013). The dentate gyrus of the hippocampus: roles of transforming growth factor beta1 (TGfbeta1) and adult neurogenesis in the expression of spatial memory Thesis (Ph D), University of Toronto (Canada), 2013.

Meshi, D., M. R. Drew, M. Saxe, M. S. Ansorge, D. David, L. Santarelli, C. Malapani, H. Moore and R. Hen (2006). "Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment." Nat Neurosci **9**(6): 729-731.

Millhouse, O. E. (1986). "The intercalated cells of the amygdala." J Comp Neurol **247**(2): 246-271.

Millhouse, O. E. and J. DeOlmos (1983). "Neuronal configurations in lateral and basolateral amygdala." Neuroscience **10**(4): 1269-1300.

Ming, G. L. and H. Song (2005). "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system." Annu Rev Neurosci **28**: 223-250.

Mohammed, A. H., B. G. Henriksson, S. Soderstrom, T. Ebendal, T. Olsson and J. R. Seckl (1993). "Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat." Behav Brain Res **57**(2): 183-191.

Moita, M. A., S. Rosis, Y. Zhou, J. E. LeDoux and H. T. Blair (2004). "Putting fear in its place: remapping of hippocampal place cells during fear conditioning." J Neurosci **24**(31): 7015-7023.

Morshead, C. M., B. A. Reynolds, C. G. Craig, M. W. McBurney, W. A. Staines, D. Morassutti, S. Weiss and D. van der Kooy (1994). "Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells." Neuron **13**(5): 1071-1082.

Muller, R., R. Bravo, J. Burckhardt and T. Curran (1984). "Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc." Nature **312**(5996): 716-720.

Neumann, D. L. and E. Kitlertsirivatana (2010). "Exposure to a novel context after extinction causes a renewal of extinguished conditioned responses: implications for the treatment of fear." Behav Res Ther **48**(6): 565-570.

Nottebohm, F. (2002). "Neuronal replacement in adult brain." Brain Res Bull **57**(6): 737-749.

Orsini, C. A. y. M., S. (2012). "Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation." Neurosci Biobehav Rev **36**(7): 1773-1802.

Pavlov, I. P. (1927). Conditioned reflexes; an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. [London], Oxford University Press.

Phelps, E. A. and J. E. LeDoux (2005). "Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior." Neuron **48**(2): 175-187.

Polack, C. W., M. A. Laborda and R. R. Miller (2013). "On the differences in degree of renewal produced by the different renewal designs." Behav Processes **99**: 112-120.

Rajasethupathy, P., S. Sankaran, J. H. Marshel, C. K. Kim, E. Ferenczi, S. Y. Lee, A. Berndt, C. Ramakrishnan, A. Jaffe, M. Lo, C. Liston and K. Deisseroth (2015). "Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval." Nature **526**(7575): 653-659.

Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." Science **255**(5052): 1707-1710.

Rosas, J. M., T. P. Todd and M. E. Bouton (2013). "Context Change and Associative Learning." Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci **4**(3): 237-244.

Royer, S., M. Martina and D. Pare (1999). "An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala." J Neurosci **19**(23): 10575-10583.

Royer, S., M. Martina and D. Pare (2000). "Bistable behavior of inhibitory neurons controlling impulse traffic through the amygdala: role of a slowly deinactivating K⁺ current." J Neurosci **20**(24): 9034-9039.

Rudy, J. W., N. C. Huff and P. Matus-Amat (2004). "Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model." Neurosci Biobehav Rev **28**(7): 675-685.

Schiess, M. C., P. M. Callahan and H. Zheng (1999). "Characterization of the electrophysiological and morphological properties of rat central amygdala neurons in vitro." J Neurosci Res **58**(5): 663-673.

Shors, T. J., D. A. Townsend, M. Zhao, Y. Kozorovitskiy and E. Gould (2002). "Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning." Hippocampus **12**(5): 578-584.

Sierra-Mercado, D., N. Padilla-Coreano and G. J. Quirk (2011). "Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear." Neuropsychopharmacology **36**(2): 529-538.

Sotres-Bayon, F., C. K. Cain and J. E. LeDoux (2006). "Brain mechanisms of fear extinction: historical perspectives on the contribution of prefrontal cortex." Biol Psychiatry **60**(4): 329-336.

Sotres-Bayon, F. and G. J. Quirk (2010). "Prefrontal control of fear: more than just extinction." Curr Opin Neurobiol **20**(2): 231-235.

Sotres-Bayon, F., D. Sierra-Mercado, E. Pardiña-Delgado and G. J. Quirk (2012). "Gating of fear in prelimbic cortex by hippocampal and amygdala inputs." Neuron **76**(4): 804-812.

Tanapat, P., N. B. Hastings, A. J. Reeves and E. Gould (1999). "Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat." J Neurosci **19**(14): 5792-5801.

Tashiro, A., H. Makino and F. H. Gage (2007). "Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage." J Neurosci **27**(12): 3252-3259.

Treves, A. and E. T. Rolls (1994). "Computational analysis of the role of the hippocampus in memory." Hippocampus **4**(3): 374-391.

Valjakka, A., J. Vartiainen, L. Tuomisto, J. T. Tuomisto, H. Olkkonen and M. M. Airaksinen (1998). "The fasciculus retroflexus controls the integrity of REM sleep by supporting the generation of hippocampal theta rhythm and rapid eye movements in rats." Brain Res Bull **47**(2): 171-184.

van Praag, H., B. R. Christie, T. J. Sejnowski and F. H. Gage (1999). "Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13427-13431.

van Praag, H., G. Kempermann and F. H. Gage (1999). "Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus." Nat Neurosci **2**(3): 266-270.

van Praag, H., G. Kempermann and F. H. Gage (2000). "Neural consequences of environmental enrichment." Nat Rev Neurosci **1**(3): 191-198.

Vervliet, B., M. G. Craske and D. Hermans (2013). "Fear extinction and relapse: state of the art." Annu Rev Clin Psychol **9**: 215-248.

Weisz, V. I. and P. F. Argibay (2009). "A putative role for neurogenesis in neuro-computational terms: inferences from a hippocampal model." Cognition **112**(2): 229-240.

Weisz, V. I. and P. F. Argibay (2012). "Neurogenesis interferes with the retrieval of remote memories: forgetting in neurocomputational terms." Cognition **125**(1): 13-25.

Westbrook, R. F., M. Iordanova, G. McNally, R. Richardson and J. A. Harris (2002). "Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus: two roles for context." J Exp Psychol Anim Behav Process **28**(1): 97-110.

Witter, M. P., P. A. Naber, T. van Haeften, W. C. Machielsen, S. A. Rombouts, F. Barkhof, P. Scheltens and F. H. Lopes da Silva (2000). "Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways." Hippocampus **10**(4): 398-410.

Young, D., P. A. Lawlor, P. Leone, M. Dragunow and M. J. During (1999). "Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective." Nat Med **5**(4): 448-453.

Zhao, C., E. M. Teng, R. G. Summers, Jr., G. L. Ming and F. H. Gage (2006). "Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus." J Neurosci **26**(1): 3-11.

Zhao, M., Y. S. Choi, K. Obrietan and S. M. Dudek (2007). "Synaptic plasticity (and the lack thereof) in hippocampal CA2 neurons." J Neurosci **27**(44): 12025-12032.

Ramon y Cajal S. 1913. Degeneration and Regeneration of the Nervous System. London: Oxford Univ. Press

