



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**PAPEL DE LA CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL EN LA CONSOLIDACIÓN DE LA  
MEMORIA DE LA TAREA DE EVITACIÓN INHIBITORIA**

**T E S I S**

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

**PRESENTA**

**MARÍA EVELINA TORRES GARCÍA**

**TUTOR**

**DR. ROBERTO AGUSTÍN PRADO ALCALÁ**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ**  
**FACULTAD DE PSICOLOGÍA**

**DRA. MAGDALENA GIORDANO NOYOLA**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**JURIQUILLA, QUERETARO, SEPTIEMBRE 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

Los miembros del jurado certificamos que la tesis elaborada por: María Evelina Torres García, cuyo título es: “**PAPEL DE LA CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL EN LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE LA TAREA DE EVITACIÓN INHIBITORIA**” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Doctora en Ciencias Biomédicas y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda

**Presidente**

Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá

**Secretario (Tutor)**

Dr. José Fernando Peña Ortega

**Vocal**

Dra. Selva Lucia Arancibia Rivas

**Suplente**

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

**Suplente**

Aprobado por el Comité Académico

---

Coordinador del Programa

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Neurobiología, en especial a mi tutor, el Dr. Roberto A. Prado Alcalá, por permitirme seguir aprendiendo al darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo. Por su paciencia, sus consejos y su guía a lo largo de la realización de este proyecto.

Mi comité tutor, formado por la Dra. Martha Escobar Rodríguez y la Dra. Magdalena Giordano Noyola, por sus valiosos aportes y por la orientación en el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al Dr. Gonzalo Flores y al Dr. Rubén Vázquez, por la colaboración académica que se logró establecer y por compartir su espacio de trabajo en la realización de la técnica de tinción Golgi-Cox.

A la Dra. A. Cristina Medina Fregoso, por el tiempo brindado y su gran ayuda en los experimentos y el procesamiento de datos, sus aportaciones e ideas.

A la M. V. Z. Norma Serafín López, por el apoyo técnico que fue vital para el desarrollo de este proyecto de investigación.

A los miembros del jurado formado por...

Al Sr. Ángel Méndez, por el cuidado de los animales, su amistad y apoyo incondicional.

A la Sra. Bertha Islas por su colaboración con el manejo del bioterio.

A todos los integrantes del Laboratorio de Aprendizaje y Memoria. Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva. Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México.

A las siguientes personas de las unidades de apoyo del Instituto de Neurobiología Campus UNAM-Juriquilla:

Microscopía: Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos,

Bioterio: M. V. Z. José Martín García y a la Dra. Alejandra Castilla León.

Cómputo: Ingenieros Ramón Martínez, Alberto Lara y Omar González

Enseñanza y Posgrado: Mtra. Leonor Casanova y Ma. Carmen Mendoza López.

Biblioteca: Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela y Lic. Soledad Medina Malagón.

Videoconferencia: María de Lourdes Lara Ayala y Sandra Hernández García.

Al Doctorado en Ciencias Biomédicas, en especial a la Dra. Aurea Orozco y al Dr. Pavel Rueda.

A las entidades que contribuyeron con financiación:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero por la beca de Doctorado (245656) y por el donativo de investigación (CONACYT; 237570).

Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal (UNAM; IN201415).

---

## RESUMEN

---

Actualmente, se ha tratado de dilucidar el papel que tiene la corteza prefrontal medial (CPFm) en las memorias aversivas. La CPFm presenta heterogeneidad anatomo funcional a lo largo del eje dorsoventral, regionalizándola en: el área del cíngulo anterior (ACa), región prelímbica (PL) e infralímbica (IL), a cada región se le ha atribuido un rol en la adquisición, recuperación y extinción de eventos aversivos, respectivamente. Por otra parte, se ha demostrado que el entrenamiento con estímulos aversivos de alta intensidad en la tarea de evitación inhibitoria (EI) impide los efectos de tratamientos que usualmente interfieren con la consolidación de la memoria, independientemente de las regiones cerebrales afectadas. Por ello, decidimos evaluar la participación de la CPFm en la consolidación de la memoria de EI tanto en condiciones de entrenamiento moderado (1.0 mA) como (3.0 mA), mediante dos estrategias experimentales: 1) evaluando los cambios que ocurren en las espinas dendríticas en las neuronas piramidales (capa III) de cada región de la CPFm después del entrenamiento (6 h y 24 h después) y 2) por medio de la inactivación de cada región de la CPFm con TTX antes del entrenamiento en la tarea de EI. Se observó que el entrenamiento en EI podría inducir modificaciones morfológicas en las espinas dendríticas, sin embargo, los resultados no fueron lo suficientemente claros como para determinar la participación de cada una de las regiones de la CPFm en la consolidación de la memoria por lo que se realizó la segunda estrategia experimental. Solo se encontró un efecto sobre la consolidación de la memoria con entrenamiento moderado cuando la inactivación se realizó en la región PL o IL. En esta última, se observó un efecto dependiente de estado cuando se realizó un entrenamiento intenso. En conjunto, estos resultados nos llevan a proponer que las diferentes regiones de la CPFm tienen un papel diferencial en la codificación de la memoria de EI y que el entrenamiento intenso y/o la interferencia con ciertas regiones promueve la transferencia e integración de la información a una red neuronal más amplia o diferente a la empleada en condiciones menos aversivas.

### **Palabras clave:**

Corteza prefrontal medial, consolidación de la memoria, memorias aversivas, espinas dendríticas.

---

## ABSTRACT

---

Currently, an attempt has been made to elucidate the role of the medial prefrontal cortex (mPFC) in aversive memories, such as the one derived from inhibitory avoidance (IA) training. Dissociable roles have been described for different mPFC subregions regarding various memory processes, wherein the anterior cingulate cortex (ACC), prelimbic cortex (PL), and infralimbic cortex (IL) are involved in acquisition, retrieval, and extinction of aversive events, respectively. On the other hand, it has been demonstrated that intense training impedes the effects on memory of treatments that typically interfere with memory consolidation. Therefore, we decided to evaluate the role of mPFC on memory consolidation in both moderate training (1.0 mA) and intense training (3.0 mA) conditions, using two experimental strategies: 1) evaluating the changes that occur in the dendritic spines in the pyramidal neurons (layer III) of each region of the mPFC after training (6 h and 24 h later) and 2) by inactivation of each mPFC region with TTX before training in the task of IA. It was observed that the training in IA could induce morphological modifications in the dendritic spines, however, the results were not clear enough to determine the participation of each one of the mPFC regions on memory consolidation. So, we made the second experimental strategy. An interference on memory consolidation was observed only on the moderate training group when the inactivation was performed in the PL or IL region. In the latter, a state-dependent effect was observed when an intense training was performed. Taken together, these results lead us to propose that the different regions of the mPFC have a differential role in the coding of IA memory and that an intense training and /or interference with certain regions promotes the transfer and integration of information to a wider or different neural network to that used in less aversive conditions.

**Keywords:**

Medial prefrontal cortex, memory consolidation, aversive memories, dendritic spin

---

# ÍNDICE

---

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>X</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
2.1. CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA .....	3
2.1.1. <i>CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA ANTE ENTRENAMIENTO INTENSO EN EI</i> .....	5
2.2. PLASTICIDAD SINÁPTICA .....	6
2.3. PLASTICIDAD ESTRUCTURAL: ESPINAS DENDRÍTICAS .....	8
2.3.1. <i>Estructura y tipos de espinas dendríticas</i> .....	9
2.3.2. <i>Espinas dendríticas y su relación con la memoria</i> .....	13
2.4. CPFm: ESTRUCTURA CLAVE PARA LA CODIFICACIÓN DE LA MEMORIA .....	14
2.5. NEURONAS PIRAMIDALES DE LA CPFm, ESPINAS Y MEMORIA .....	19
<b>3. HIPOTESIS GENERALES</b> .....	<b>22</b>
<b>4. OBJETIVOS GENERALES</b> .....	<b>22</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
5.1. SUJETOS .....	23
5.2. MANIPULACIÓN .....	23
5.3. PROCEDIMIENTOS CONDUCTUALES .....	24
5.3.1. <i>EVITACIÓN INHIBITORIA</i> .....	24
5.3.2. <i>SESIÓN DE ENTRENAMIENTO</i> .....	24
5.3.3. <i>SESIÓN DE PRUEBA DE RETENCIÓN Y DE EXTINCIÓN</i> .....	25
5.4. DENSIDAD Y MORFOLOGÍA DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS DE LA CPFm DESPUÉS DEL ENTRENAMIENTO EN LA TAREA DE EI .....	25
5.4.1. <i>ESQUEMA DE TRABAJO</i> .....	25
5.4.2. <i>OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS</i> .....	27
5.4.3. <i>TÉCNICA DE GOLGI-COX</i> .....	27
5.4.5. <i>CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS</i> .....	27
5.5. INACTIVACIÓN TEMPORAL DE CADA REGIÓN DE LA CPFm .....	28
5.5.1. <i>DIAGRAMA DE TRABAJO</i> .....	28
5.5.2. <i>CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA</i> .....	28
5.5.3. <i>INFUSIÓN DE LOS FÁRMACOS</i> .....	29
5.5.4. <i>ANÁLISIS HISTOLÓGICO</i> .....	30
5.5.5. <i>INMUNOHISTOQUÍMICA PARA c-FOS</i> .....	30
5.5.6. <i>CUANTIFICACIÓN DE CORTICOSTERONA</i> .....	32
5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	33
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>



6.1. DENSIDAD Y MORFOLOGÍA DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS DE LA CPFm DESPUÉS DEL ENTRENAMIENTO EN LA TAREA DE EI .....	35
6.1.1. RESULTADOS CONDUCTUALES .....	35
6.2. RESULTADOS HISTOLOGICOS DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS .....	37
6.2.1. ÁREA DEL CÍNGULO ANTERIOR.....	38
6.2.2. REGIÓN PRELÍMBICA .....	40
6.2.3. REGIÓN INFRALÍMBICA .....	43
6.3. RESULTADOS DE LA INACTIVACIÓN DE LA CPFm.....	45
6.3.1. ÁREA DEL CÍNGULO ANTERIOR.....	45
6.3.2. REGIÓN PRELÍMBICA .....	47
6.3.4. REGIÓN INFRALÍMBICA .....	50
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
7.1. ÁREA DEL CÍNGULO ANTERIOR.....	56
7.2. REGIÓN PRELÍMBICA.....	59
7.3. REGIÓN INFRALÍMBICA .....	61
7.3.1. REGIÓN INFRALÍMBICA Y DEPENDENCIA DE ESTADO .....	65
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>68</b>
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>69</b>
<b>10. PUEBLICACIÓN CIENTÍFICA.....</b>	<b>87</b>

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1. Clasificación temporal de la memoria. MCP y MLP.....	4
Figura 2. Mecanismos moleculares asociados a la LTP.....	8
Figura 3. Tipos de espinas dendríticas .....	10
Figura 4. Componentes moleculares asociados a la estabilización de las espinas dendríticas.....	12
Figura 5. Correlación entre el tamaño de la cabeza de la espina y fortalecimiento de la sinapsis.. ..	14
Figura 6. Subdivisión de la CPFm y su correlato con el humano. ....	16
Figura 7. Diagrama del diseño experimental I. ....	26
Figura 8. Diagrama del diseño experimental II. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 9. Resultados conductuales en la tarea de evitación inhibitoria.....	36
Figura 10. Fotomicrografía de espinas dendríticas de neuronas piramidales de CPFm capa III.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 11. Resultados de la cuantificación y análisis morfológico de las espinas dendríticas en ACa.....	39
Figura 12. Representación gráfica de la proporción de espinas cortas, largas y hongo en ACa. ....	40
Figura 13. Resultados de la cuantificación y análisis morfológico de las espinas dendríticas en PL .....	41
Figura 14. Representación gráfica de la proporción de espinas cortas, largas y hongo de la región PL encontradas en cada grupo de interés evaluado 6 h y 24 horas después del entrenamiento. ....	42
Figura 15. Resultados de la cuantificación y análisis morfológico de las espinas dendríticas en IL. ....	44
Figura 16. Representación gráfica de la proporción de espinas cortas, largas y hongo de la región IL....	45
Figura 17. La inactivación del ACa no provoca deterioro en la MLP de la tarea de EI.....	47
Figura 18. Efecto protector del entrenamiento intenso ante la inactivación de la región PL.. ..	49
Figura 19. Efecto protector del entrenamiento intenso ante la inactivación de la región IL y un caso de dependencia de estado.....	51
Figura 20. La concentración de CORT en suero de acuerdo con la intensidad e inactivación de IL .....	53

---

## ABREVIATURAS

---

<b>EI</b>	Evitación inhibitoria
<b>CPFm</b>	Corteza prefrontal medial
<b>IL</b>	Región infralímbica
<b>PL</b>	Región prelímbica
<b>ACa</b>	Área del cíngulo anterior
<b>TTX</b>	Tetrodotoxina
<b>MCP</b>	Memoria de corto plazo
<b>MLP</b>	Memoria de largo plazo
<b>LTP</b>	Potenciación a largo plazo
<b>AMPA</b>	ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>CAMKII</b>	Proteína quinasa Ca <sup>+2</sup> /calmodulina II
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos
<b>CREB</b>	Proteína de unión al elemento CRE
<b>CRE</b>	Elemento de respuesta a AMPc
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>PSD</b>	Densidad post-sináptica
<b>GEF's</b>	Factores intercambiadores de guanina
<b>NCAM</b>	Molécula de adhesión celular neuronal
<b>PPI</b>	Proteína fosfatasa 1

<b>TrKB</b>	Receptor de tirosina quinasa B
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro
<b>AMI</b>	Amígdala
<b>PVH</b>	Núcleo paraventricular del hipotálamo
<b>HHA</b>	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotropa, corticotropina o corticotrofina
<b>CRH</b>	Hormona liberadora de corticotropina
<b>CORT</b>	Corticosterona
<b>AVT</b>	Área ventral tegmental
<b>D1</b>	Receptores de dopamina tipo 1
<b>D5</b>	Receptores de dopamina tipo 5
<b>BIO</b>	Grupo bioterio
<b>SCH</b>	Grupo solo choque
<b>DV</b>	Dorso-ventral
<b>ML</b>	Medio-lateral
<b>AP</b>	Antero-posterior
<b>VEH</b>	Vehículo

---

## 1. INTRODUCCIÓN

---

La habilidad para formar asociaciones adecuadas entre eventos aversivos y los estímulos que lo predicen y así responder con la conducta apropiada es fundamental para la sobrevivencia de distintos organismos, por ejemplo, cuando evitamos colocar la mano sobre una parrilla caliente para evadir una quemadura. De manera experimental, se han estudiado estas modificaciones conductuales y su asociación con cambios en el sistema nervioso en modelos animales. En la tarea de evitación inhibitoria (EI), los roedores pueden asociar un lugar en una caja de condicionamiento con un estímulo aversivo (choque eléctrico). Si el animal hace una correcta asociación, evitará el lugar donde recibió el castigo, y una vez aprendida esta tarea se almacena en la memoria, y para que ésta pueda ser estable y duradera debe pasar por un proceso denominado consolidación (Dudai, 2004; McGaugh, 2000). Una característica de la consolidación es que se vale de la actividad neuronal en distintas regiones cerebrales en una ventana temporal restringida (1-6 h). La consolidación de memorias emotivas, requieren de la participación orquestada de varias estructuras entre las que encontramos al hipocampo, el estriado, la sustancia nigra y la amígdala. Esto ha sido demostrado mediante la interferencia, en estas regiones, con diferentes procesos o moléculas presentes en la neurona (neurotransmisores, síntesis de proteínas, canales iónicos), requeridos para su consolidación.

No obstante, en nuestro laboratorio hemos encontrado que el entrenamiento en la tarea de EI con intensidades relativamente altas de choque eléctrico bloquea el efecto de tratamientos farmacológicos que usualmente interfieren con el proceso de consolidación de la memoria, en las estructuras cerebrales como el hipocampo (Garín-Aguilar, Medina, Quirarte, McGaugh, y Prado-Alcalá, 2014; Quiroz et al., 2003), la amígdala, la sustancia nigra y el estriado (Salado-Castillo et al. 2011) sugiriendo que bajo estas condiciones de alta intensidad de entrenamiento se activan estructuras distintas a aquellas usualmente involucradas en la consolidación de la memoria. Efectos similares han sido reportados por otros grupos de investigación, por ejemplo la participación de la corteza prefrontal medial (CPFm) ha llamado la atención en la formación de la memoria, durante eventos aversivos

(Mello e Souza et al. 1999; Yang y Liang 2014; Zhang et al.,2011). Debido a su conectividad, la CPFm se ha considerado como el mayor modulador de la conducta, ya que permite regular las respuestas sensoriales, el aprendizaje y memoria emocional y la expresión del miedo (Courtin et al., 2013). Alteraciones en la CPFm están relacionadas con el estrés postraumático (Pitman et al., 2012). Esta estructura en el plano ventral a dorsal, consta de tres regiones: corteza infralímbica (IL), corteza prelímbica (PL) y el área del cíngulo anterior (ACa). Se piensa que cada una juega un papel diferente a lo largo de las distintas etapas y tipos de memoria. Evidencias experimentales correlacionan la actividad de la región IL con el proceso de extinción (Quirk y Mueller, 2008) y el control del miedo (Sotres-Bayon y Quirk, 2010); a la región PL se relaciona con la expresión del miedo (evocación) (Blum et al., 2006; Vidal-Gonzalez et al., 2006) y al ACa con el proceso de adquisición (Bissière et al., 2008; Sacchetti, et al., 2003; Tang et al., 2005). Además, estudios recientes han demostrado que en la CPFm ocurren cambios plásticos, reflejados en modificaciones estructurales y funcionales en las espinas dendríticas de las neuronas piramidales que podrían estar asociados a la formación de la memoria de eventos aversivos. Cabe señalar que la mayoría de estas evidencias provienen de experimentos realizados con tareas de condicionamiento al miedo, donde los sujetos manifiestan respuestas de defensa pasiva (congelamiento), mientras que en la tarea de EI los sujetos tienen respuestas activas y consientes (evitación); los sustratos anatómicos para cada uno de estos tipos de respuestas podría involucrar diferentes circuitos neurales (Bravo-Rivera et al. 2014; Bravo-Rivera et al., 2015).

Tomando en cuenta la relación anatomo funcional de la CPFm con estructuras estrechamente vinculadas con la formación de la memoria de la tarea de EI decidimos evaluar la participación de cada región de la CPFm en la consolidación de la memoria de esta tarea en condiciones de entrenamiento moderado (1.0 mA) y de entrenamiento intenso (3.0 mA). Esto mediante dos estrategias experimentales: 1) evaluando los cambios que ocurren en las espinas dendríticas en las neuronas piramidales (capa III) de cada región de la CPFm después del entrenamiento (6 h y 24 h después) y 2) por medio de la inactivación de cada región de la CPFm con TTX antes del entrenamiento en la tarea de EI.

---

## 2. ANTECEDENTES

---

### 2.1. CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA

Antes de hablar acerca de la consolidación de la memoria es importante considerar dos conceptos básicos, el aprendizaje y la memoria. Desde el punto de vista neurobiológico, el aprendizaje se considera un cambio que ocurre en las respuestas conductuales de un organismo derivado de la experiencia, este cambio conductual no se debe a fatiga, maduración o evolución (Morgado, 2005). Por su parte, la memoria se refiere al fenómeno por el cual se retiene o se almacena la información adquirida, la cual puede ser recuperada a lo largo del tiempo. Según su temporalidad, la memoria se clasifica en memoria de corto y largo plazo (MCP y MLP, respectivamente). Mientras que la MCP tiene una capacidad limitada, es frágil y de corta duración, la MLP no tiene un límite conocido y puede, incluso, almacenar información de manera permanente (Tulving, 1987). Este almacén de la información podría ocurrir en lo que Lashley denominó engrama o trazo de memoria, refiriéndose a la representación de la memoria en el cerebro (Bruce, 2001).

La duración de la memoria puede estar dada en función del número de repeticiones del evento, de la intensidad o magnitud del estímulo asociado a la experiencia a recordar y/o que la experiencia contenga un importante componente emocional (Cowan, 2008; Kandel et al., 2013; Prado-Alacalá et al., 2007)). Müller y Pilzecker (1900) propusieron que la información adquirida se estabiliza de una MCP a una MLP mediante un proceso dependiente del tiempo que denominaron consolidación, hipótesis que ha predominado hasta ahora.

Podemos decir entonces que la memoria presenta diferentes fases: adquisición o aprendizaje, la consolidación y la evocación o recuerdo (McGaugh, 2000; Wang et al., 2006), que se resumen y esquematizan en la siguiente imagen (Figura 1).

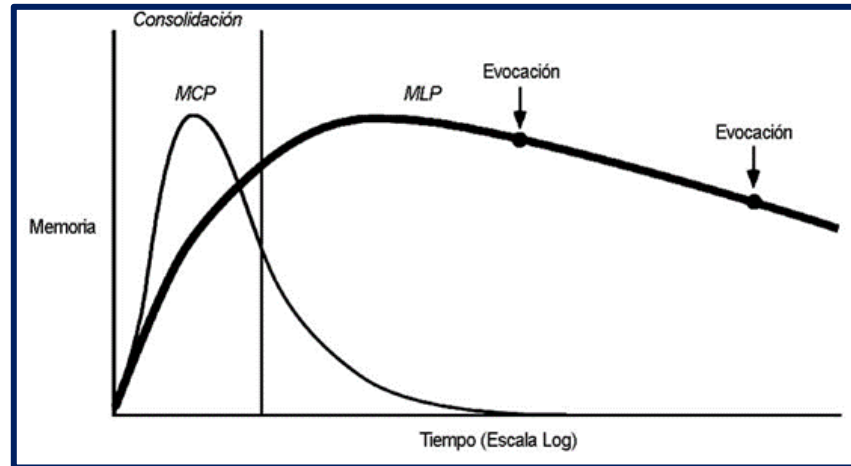


Figura 1. Clasificación temporal de la memoria. MCP y MLP. Modificada de Dudai (2004).

Diversos estudios sugieren que para que pueda llevarse a cabo el proceso hipotético de consolidación se requiere de una serie de cambios a nivel celular y de sistemas para la estabilización de las memorias, conocidos como proceso de consolidación celular y de consolidación de sistemas, respectivamente (Dudai, 2002; Kandel, 2001; Squire y Zola-Morgan, 1988; Stork y Welzl, 1999). El término de consolidación celular se usa comúnmente para describir los eventos que ocurren a nivel sináptico o celular (por ejemplo, síntesis de proteínas) y que se llevan a cabo en las primeras horas después de la adquisición para permitir la plasticidad y estabilización sináptica, la cual se tratará más adelante. En este periodo de tiempo, la memoria se vuelve susceptible a interferencias o interrupciones, para el caso de la tarea de EI se piensa que este periodo de consolidación podría ocurrir dentro de las primeras 6 horas, esto de acuerdo con estudios realizados por Igaz y colaboradores (2002) en los que la administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas directamente en el hipocampo, 3, 4.5, o 6 horas después del entrenamiento de la tarea de EI, interfiere con el proceso de consolidación de la memoria. Estos resultados además coinciden con los cambios en la expresión génica observados en la misma tarea. Por ejemplo un trabajo realizado por O' Sullivan y colaboradores (2007), utilizando la técnica de microarreglos observaron que la expresión de diversos genes, que podrían estar participando en el remodelamiento sináptico necesario para que se lleve a cabo la formación de la memoria, ocurre de manera temporal y



dentro de las primeras 6 horas posteriores al entrenamiento, los autores plantean que estos cambios en la expresión génica a través del tiempo podrían estar relacionados con los cambios requeridos en la plasticidad sináptica para que se lleve a cabo la formación de la memoria, como son la pérdida, reorganización y la selección sináptica.

Por otra parte, la consolidación de sistemas se refiere a la reorganización gradual de los sistemas cerebrales implicados con la memoria, y se ha propuesto que inicialmente se lleva a cabo en el hipocampo y posteriormente involucra a otros circuitos más extensos en otras estructuras como la amígdala, el estriado o la corteza, dependiendo del tipo de información a almacenar (Dudai, 2012; Dudai y Morris 2000; Euston et al., 2013; Squire y Alvarez 1995). Debido a que el interés de este trabajo fue determinar el papel de la corteza prefrontal, nos centraremos únicamente en esta estructura cerebral y en su asociación con la memoria.

### **2.1.1. CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA ANTE ENTRENAMIENTO INTENSO EN EI**

A pesar de que la hipótesis de la consolidación de la memoria ha predominado en el campo del estudio de la memoria y el aprendizaje, ésta también ha sido cuestionada debido a que no se cumple bajo ciertas condiciones experimentales. Ejemplo de ello son los resultados obtenidos en el laboratorio ante el entrenamiento intenso en la tarea EI, que demuestran que variar la cantidad o intensidad del entrenamiento (entrenamiento intenso) tiene consecuencias importantes en los procesos de la memoria. Cuando el aprendizaje se lleva a cabo en estas condiciones, la formación de la memoria se protege de tratamientos usualmente amnésicos (Prado-Alcalá et al., 2012).

Este efecto protector se ha encontrado después del entrenamiento de tareas instrumentales, donde un reforzador está disponible después de la ejecución de una respuesta específica (Prado-Alcalá y Cobos-Zapalaín, 1977; Prado-Alcalá et al., 1980) y también se ha descrito en tareas que implican componentes clásicos e instrumentales, como la evitación

activa e inhibitoria. En estos casos, el animal está expuesto a un estímulo condicionado y luego a un estímulo aversivo incondicionado, independientemente de su comportamiento. Sin embargo, después del entrenamiento, en la prueba los animales pueden evitar el estímulo aversivo realizando una respuesta instrumental antes del inicio del estímulo. Así, al interferir con la actividad serotoninérgica hay una alteración tanto de la adquisición y de la retención de la tarea de evitación activa después del entrenamiento con intensidades de choque relativamente bajas, pero no cuando se entrena con intensidades de choque más altas (Galindo et al., 2008). De manera similar, las lesiones electrolíticas de los núcleos lateral y basal de la amígdala dificultaron la adquisición de una tarea de evitación de Sidman pero el entrenamiento intenso protegió el desempeño de esta tarea (Lázaro-Muñoz et al., 2010). Los tratamientos amnésicos sistémicos también impiden la consolidación de la memoria de EI, pero no se produce tal déficit después del entrenamiento intenso (Cruz-Morales et al., 1992; Díaz-Trujillo et al., 2009; Duran-Arevalo et al., 1990). Lo mismo ocurre cuando se administran tratamientos intracerebrales, como en el estriado (Giordano y Prado-Alcalá, 1986; Pérez-Ruiz y Prado-Alcalá, 1989; Rigoberto Salado-Castillo, 2011), en el hipocampo (Garín-Aguilar et al., 2014; Quiroz et al., 2003), en la amígdala (Parent et al., 1992) o en la sustancia nigra (Cobos-Zapíaín et al., 1996). Estos resultados llevan a la propuesta de que el entrenamiento intenso y/o la interferencia con ciertas regiones promueve la transferencia e integración de la información a una red neuronal más amplia o diferente a la empleada en condiciones menos aversivas.

## **2.2. PLASTICIDAD SINÁPTICA**

Desde el punto de vista neurobiológico y neurofisiológico, las células del sistema nervioso deben tener la habilidad de modificar su función y estructura como resultado de la actividad que se le presente, con el fin de que pueda llevarse a cabo el aprendizaje y la consolidación de la memoria, entre otras funciones. A este fenómeno se le ha denominado plasticidad sináptica y se refiere a los cambios en la eficiencia sináptica que permiten el fortalecimiento de las conexiones funcionales entre las neuronas (Sutton y Schuman, 2006). Desde hace poco más de un siglo Santiago Ramón y Cajal había llegado a esta conjetura y casi 50 años más tarde, el psicobiólogo Donald O. Hebb añadió a esta idea, la propuesta de que el

fortalecimiento de la sinapsis ocurre cuando la presinapsis y la posinapsis se encuentran coactivadas, sugiriendo que la plasticidad asociativa podría funcionar como un mecanismo de aprendizaje (Hebb, 1949). Desde 1973, gracias a los trabajos realizados por Bliss y Lomo, existe un modelo que podría ayudar a explicar las modificaciones plásticas que ocurren a nivel celular, denominado potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés), con este modelo se demostró que la estimulación moderada de alta frecuencia en la misma una vía aferente hipocampal produce un incremento estable y duradero en la amplitud de la repuesta sináptica (eficiencia sináptica), que podría durar días e incluso semanas. Es importante recalcar que la LTP no es exclusiva del hipocampo, si no que ha sido registrada en otras regiones, incluyendo a la corteza y se piensa que los mecanismos moleculares involucrados en la generación de la LTP podrían compartir elementos en cada región cerebral.

Actualmente se propone que existen elementos clave para que pueda llevarse a cabo la LTP, que van desde los iones, receptores, enzimas, proteínas estructurales, así como eventos moleculares, como los procesos de traducción y transcripción. El mecanismo propuesto hasta ahora para la formación de la LTP comienza con la liberación del neurotransmisor glutamato por la terminal presináptica en el espacio extracelular, el glutamato se une a sus receptores AMPA, presentes en la posinápsis que permiten la entrada de sodio ( $\text{Na}^+$ ) hacia el interior de la neurona. Esta entrada de  $\text{Na}^+$  despolariza a la membrana y permite que el ion magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), que bloquea a los receptores NMDA, sea removido. Ya activos los receptores NMDA entrará calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), además de  $\text{Na}^+$  y una vez que entra el  $\text{Ca}^{2+}$ , se inicia una cascada de señalización que comienza con la activación de la proteína calmodulina. La interacción calcio-calmodulina activa a una de las enzimas con actividad quinasa que es clave para la LTP y para la formación de la memoria, la CaMKII (Proteína quinasa  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina II). Además, la calcio-calmodulina activa al adenilato ciclasa que produce AMPc, a partir de ATP, para activar a la quinasa PKA. La CaMKII, la PKA, y otras quinasas como la PKC y la MAPK, permiten la fosforilación de otras proteínas, algunas de éstas llegan al núcleo, y estimulan la actividad de varios factores de transcripción, entre ellos el CREB (Dudai, 1989). De este modo, determinados genes que contienen al elemento de respuesta a AMPc (CRE, por sus siglas en inglés) se activan y codifican proteínas

relacionadas con los cambios estructurales de la neurona que pueden ocurrir de manera transitoria o duradera.

Ciertos neuromoduladores también pueden tener un efecto sobre la LTP, por ejemplo, la dopamina, noradrenalina, cannabinoides o glucocorticoides. En la siguiente imagen se resume de manera general los eventos que ocurren en la LTP.

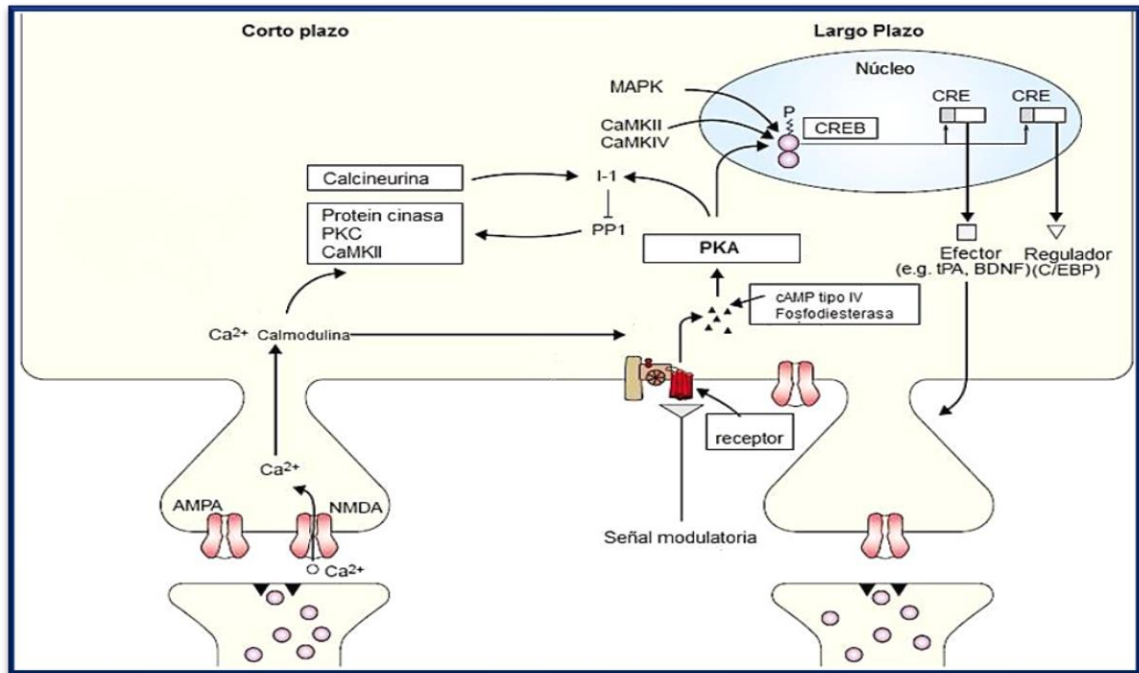


Figura 2. Mecanismos moleculares asociados a la LTP. Se distinguen dos etapas: la fase temprana de la LTP (corto plazo), que consta de la activación de cascadas de señalización que favorecen la comunicación sináptica haciéndola más eficiente y la fase tardía de la LTP (largo plazo), en esta, los elementos fundamentales son la expresión génica con el fin de promover la formación de nuevos contactos sinápticos (Modificado de Abel y Lattal 2001).

### 2.3. PLASTICIDAD ESTRUCTURAL: ESPINAS DENDRÍTICAS

Además de la “plasticidad funcional”, otro aspecto asociado a la plasticidad sináptica y al aprendizaje y memoria es el de “plasticidad estructural”, la cual se refiere a las modificaciones morfológicas que ocurren a nivel de las espinas dendríticas de la neurona (Bosch y Hayashi, 2012). Estas espinas dendríticas son unidades multifuncionales postsinápticas que emanan del citoplasma de las dendritas neuronales y son altamente

dinámicas, ya que tienen la capacidad de cambiar su morfología, número, densidad y motilidad en respuesta a estímulos tanto internos como externos en cuestión de minutos. Fueron descubiertas y descritas hace más de un siglo por Santiago Ramón y Cajal, quién al observarlas mediante la técnica Golgi encontró que las espinas están presentes en diversos subtipos neuronales de distintas regiones del cerebro y que, además, son relativamente consistentes en distintas especies animales. La observación e hipótesis más importante que aportó Cajal es que las espinas dendríticas pueden aumentar la superficie de contacto entre neuronas para poder organizar el gran número de sinapsis en el cerebro (Ramón y Cajal, 1984; citado por Yuste 2015).

De acuerdo con las investigaciones realizadas por Cajal y con el apoyo de las primeras teorías que intentaron explicar las bases morfofuncionales de la memoria, entre las que destacan la teoría del engrama de Lashley (Bruce, 2001), la de los circuitos reverberantes propuesta por Hebb (1949), así como los descubrimientos de Bliss y Lomo (1973) y aquellas más recientes que tienen un enfoque molecular, no hay duda de que la plasticidad estructural de las espinas está íntimamente relacionada con cambios en la eficiencia sináptica, el aprendizaje, la memoria y otros procesos cognoscitivos. Por ello, actualmente, se considera a las espinas dendríticas como estructuras clave para la señalización y conectividad del sistema nervioso.

### **2.3.1. Estructura y tipos de espinas dendríticas**

En general, una espina dendrítica mide de 1 a 3  $\mu\text{m}$  de largo, con un volumen de 0.01 a 0.8  $\mu\text{m}^3$  y puede o no presentar una cabeza redondeada (sitio posináptico de entradas excitatorias) localizada después de un cuello delgado que emerge de la dendrita. Las espinas dendríticas de neuronas adultas pueden tener diferente morfología y de acuerdo con esto han sido clasificadas de manera general en las siguientes categorías: corta, larga, hongo y bifurcada (Figura 3) (Harris et al., 1992). Sin embargo, pueden presentar otras formas que no corresponden a estas categorías. A lo largo de la dendrita, cada tipo de espina puede estar presente en distintas proporciones y su presencia no es permanente.

Las espinas tipo corta se caracterizan por no tener una cabeza y cuello definidos, además de ser cortas en longitud ( $<0.5 \mu\text{m}$ ) (Fiala et al., 2012; Peters y Kaiserman-Abramof, 1970). Mientras que, las espinas tipo larga se caracterizan por ser delgadas, con cuello largo y cabeza pequeña y redondeada. En las espinas tipo hongo se puede observar una cabeza más definida que es mucho mayor en diámetro que el cuello, el cual es corto y muy delgado. De manera menos frecuente, encontramos a las espinas ramificadas, que pueden ser bifurcadas o multicabeza (Arellano, 2007; Kawaguchi et al., 2006). Sin embargo, más allá de la forma que puedan adaptar las espinas, existe una maquinaria molecular compleja en cada una de ellas que permite satisfacer las demandas requeridas para mantener la homeostasis sináptica, y que puede dar lugar a cambios en la formación, estructura, estabilidad, motilidad y eliminación de la espina (Sala y Segal, 2014). A continuación, se resumen los principales elementos presentes en esta estructura neuronal, los cuales pueden variar de acuerdo con el tamaño y forma de la espina.

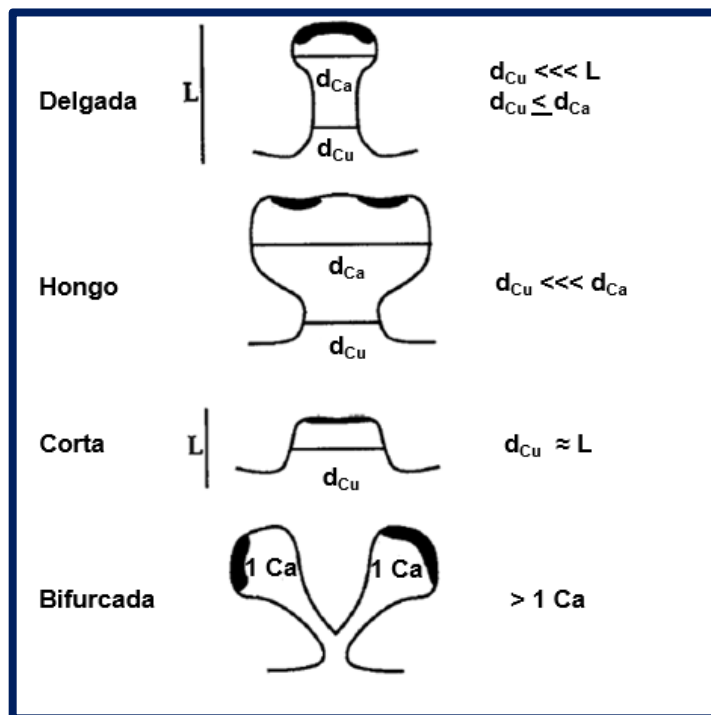


Figura 3. Tipos de espinas dendríticas. Esquema de la clasificación de algunos tipos de espinas de acuerdo con la longitud de la espina ( $L$ ), el diámetro del cuello ( $d_{Cu}$ ), e diámetro de la cabeza ( $d_{Ca}$ ), y la presencia o ausencia de esta. (Modificado de Harris et al., 1992).

El cuello y la cabeza de la espina los constituyen básicamente un citoesqueleto de actina, cuya estructura primaria está dada por la polimerización de actina G en actina F, dando lugar a los microfilamentos. La forma en que se organizan estos microfilamentos, así como la polimerización/despolimerización de actina dan lugar a la remodelación de la espina en la plasticidad sináptica (Bellot et al., 2014).

Además, podemos encontrar otras proteínas de unión a actina y proteínas del citoesqueleto, tales como la profilina, miosina, debrina, fodrina, espinofilina, neuroabina 1, cortactina y proteína asociada a microtúbulos (MAP2, por sus siglas en inglés) (Caceres et al., 1983). Estas proteínas en conjunto con la actina ayudan al reclutamiento y movilización de otras proteínas y vesículas que serán ancladas a la membrana plasmática de la espina. Un elemento importante presente en la espina dendrítica es la densidad posináptica (PSD, por sus siglas en inglés), que es un conjunto de proteínas ancladas a la membrana, las cuales son continuamente insertadas o retiradas de ella. De hecho, el volumen de la espina dendrítica es proporcional al tamaño de la PSD que a su vez se correlaciona con la presencia de receptores AMPA en la membrana presináptica y con la presencia de vesículas de glutamato ancladas en la zona activa (zona de la sinapsis donde se libera el neurotransmisor) (Holtmaat y Svoboda, 2009), sugiriendo que la PSD juega un papel importante para la estabilización de la sinapsis (De Roo et al., 2008; Steiner et al., 2008) (Figura 5). Además, la PSD contiene otros elementos importantes entre los que encontramos a los receptores ionotrópicos y metabotrópicos, canales iónicos, proteínas de endocitosis y exocitosis.

También podemos encontrar factores intercambiadores de guanina y fosfatasas (GEFs y GTPasas, por sus siglas en inglés) y otras proteínas de señalización asociadas incluyendo a RhoA, Kalrina-7 y Cdc42 (Murakoshi y Yasuda, 2012). Las moléculas de adhesión celular también están presentes como la N-caderina, las integrinas y la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM, por sus siglas en inglés) (Persohn y Schachner, 1990; Tang et al., 1998). Otros elementos importantes e involucrados en la señalización celular son los segundos mensajeros, como las cinasas CaMKII (Kelly et al., 1984) y la PKC (Wolf et al., 1986), fosfatasas como la proteína fosfatasa 1 (PP1) (Terry-Lorenzo et al., 2002); proteasas,

receptores a tirosinas (TrkB) (Tashiro y Yuste, 2003), microARNs y sus proteínas de unión (Schratt et al., 2006), factores de transcripción (Dresselhaus et al., 2018), y algunos receptores para hormonas esteroideas (glucocorticoides, estradiol) (Frankfurt y Luine, 2015; Russo et al., 2016). Esta es solo una pequeña lista de los varios cientos de proteínas, hormonas y/o factores de crecimiento que forman parte de la estructura de la espina dendrítica y de los que su presencia o ausencia podrían determinar la morfología, función y estabilidad de la espina, tal como se representa en la figura 4.

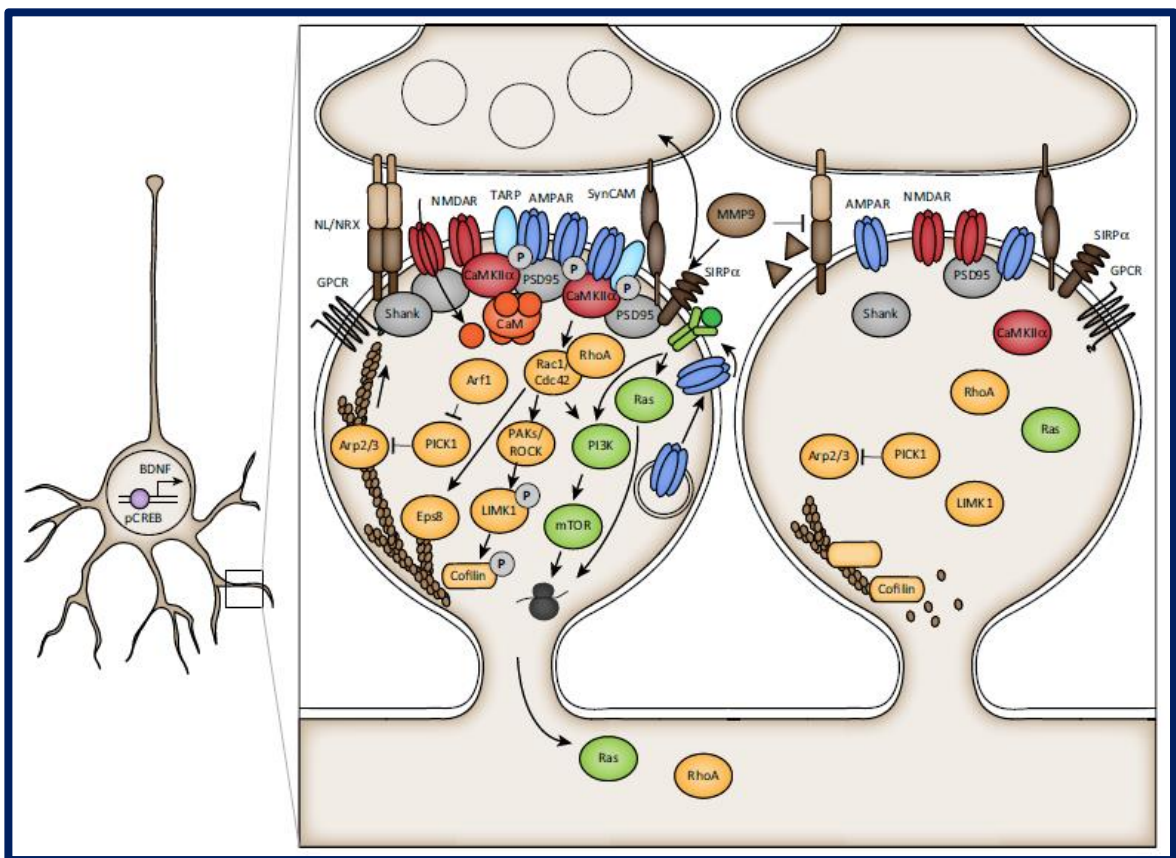


Figura 4. Componentes moleculares asociados a la estabilización de las espinas dendríticas. El esquema representa una sinapsis estabilizada (izquierda) y una sinapsis no estabilizada (derecha) de una neurona en la que se esquematiza el proceso de transcripción de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Las flechas indican los procesos que fortalecen la sinapsis y estabilidad de espina durante las primeras 12 a 18 horas después de la adquisición. Se puede observar la presencia de las proteínas asociadas a los receptores a AMPA (azul) y a NMDA (rojo), también se muestran las proteínas postsinápticas de andamiaje (gris) y los componentes que regulan el citoesqueleto de actina (amarillo) y aquellos que regulan la traducción local (verde). (Tomada de Caroni et al., 2014).



### 2.3.2. Espinas dendríticas y su relación con la memoria

Como se mencionó, se ha propuesto que la plasticidad sináptica subyace los procesos de aprendizaje y la formación y consolidación de la memoria. Esta plasticidad sináptica requiere de una “plasticidad estructural” que involucra la formación de nuevas espinas (espinogénesis) y/o remodelamiento de las espinas existentes para permitir el fortalecimiento y mantenimiento de las conexiones neuronales (sinapsis). La dinámica y plasticidad de las espinas depende de la concentración del ion  $\text{Ca}^{+2}$ , que inicia las señales transduccionales que lleva a la expresión de varias formas de plasticidad sináptica, como la LTP y la LTD, las cuales se refieren a un incremento o decremento persistente en la respuesta y fuerza sináptica, respectivamente. Por ejemplo, en las sinapsis de las colaterales de Scheffer en el hipocampo, la plasticidad sináptica está asociada con plasticidad morfológica en las espinas: alargamiento en LTP, y encogimiento o retracción en LTD. Las técnicas de microscopía *in vivo* han permitido asumir que cambios en el volumen de la espina podría ser interpretado como cambios en la fuerza sináptica. La LTP es causada por una combinación de proceso postsinápticos coordinados en tiempo y espacio, incluyendo reorganización del citoesqueleto de actina (Cingolani y Goda, 2008), exocitosis de endosomas e inserción de receptores AMPA en la sinapsis (Derkach et al., 2007), tal como se esquematiza en la figura 5. Estos eventos llevan a un incremento en la sensibilidad de los sitios postsinápticos a glutamato o en la probabilidad de liberación de glutamato de la terminal presináptica (Matsuzaki et al., 2004), aumentando así la eficiencia sináptica.

Gracias al uso paralelo de diversas técnicas desde la biología molecular, la histología la electrofisiología y la conducta, la relación entre modificaciones estructurales, como la plasticidad sináptica en el aprendizaje y memoria ha resultado más evidente, muestra de ello es el trabajo realizado por Bero y colaboradores (2014), quienes evaluaron la relación de la memoria a largo plazo de una tarea de condicionamiento de miedo al contexto con la remodelación temprana, estructural y funcional de neuronas de la CPFm. Los autores encontraron que después del condicionamiento se inicia una rápida expresión de genes, acompañada de una expansión de la zona sináptica activa y de la densidad posináptica, un

incremento en la eficiencia sináptica y un aumento en la proporción de espinas tipo hongo en las neuronas piramidales de la CPFm.

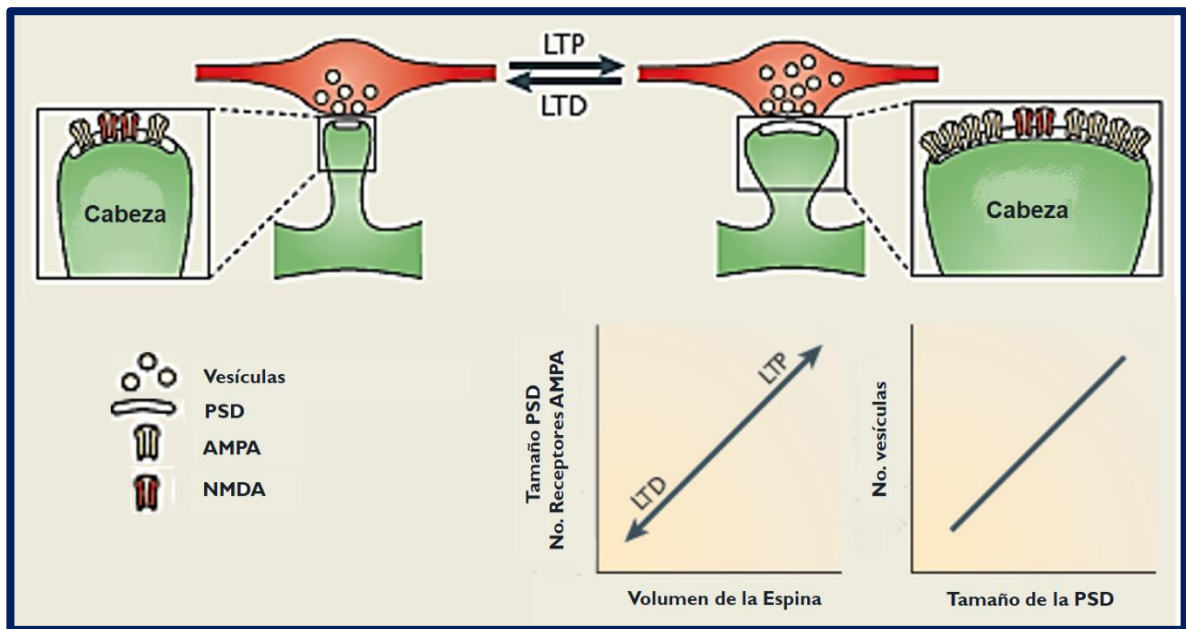


Figura 5. Correlación entre el tamaño de la cabeza de la espina y fortalecimiento de la sinapsis. El volumen de la espina dendrítica es proporcional al tamaño de la PSD que a su vez está correlacionada con la presencia de receptores AMPA en la membrana presináptica y con la presencia de vesículas de glutamato ancladas en la zona activa (Modificado de Holtmaat y Svoboda, 2009).

## 2.4. CPFm: ESTRUCTURA CLAVE PARA LA CODIFICACIÓN DE LA MEMORIA

En párrafos anteriores se mencionó que para que ocurra la consolidación de la memoria, además de los cambios plásticos a nivel celular, se requiere de la reorganización gradual de ciertos sistemas cerebrales encargados de codificar una memoria en particular. Regiones como el hipocampo y la amígdala han sido de las estructuras más estudiadas por lo que se tiene más conocimiento sobre su participación en memorias de tipo aversivo (Yadin Dudai, 2002; Dudai y Morris, 2000; Kitamura et al., 2017; Phelps y LeDoux, 2005; Squire y Alvarez, 1995). Sin embargo, en años recientes ha cobrado especial interés el papel que podría tener la corteza prefrontal en distintos procesos de la memoria, principalmente de aquellas memorias asociadas a eventos emotivos.

Generalmente atribuimos a la corteza prefrontal (CPF) el papel de modulador de la conducta debido a que es una estructura clave para las funciones ejecutivas, tales como planeación, solución de problemas y control social (Dalley et al, 2004). Además, se considera que esta región cerebral nos provee de la capacidad de hacer representaciones mentales, a través de información obtenida previamente, para emplearlas de manera adecuada y así guiar nuestros pensamientos, acciones y emociones mediante un control inhibitorio de aquellas conductas poco prudentes. Aunado a esto, estudios recientes han demostrado que la región medial de la CPF (CPFm) podría estar asociada a otras funciones, como la adquisición, evocación, modulación y consolidación de diferentes tipos de memoria (Euston et al., 2013). Además, ha adquirido especial interés el papel que podría tener esta región en diferentes procesos involucrados con las memorias aversivas y conductas de miedo, ya que ciertas interferencias en esta estructura están asociadas a algunas alteraciones psiquiátricas como estrés, ansiedad y estrés postraumático (Dahlgren et al., 2018; Radley et al., 2006; Reznikov et al., 2018).

El término de CPFm, (incluso de CPF) aplicado a roedores ha sido tema de debate desde que se iniciaron las investigaciones sobre esta región cerebral en estos organismos, por el cuestionamiento evidente de si los roedores tienen realmente una corteza prefrontal, pues esta región es la más reciente desde el punto de vista evolutivo y está bien desarrollada en humanos y no en otras especies. Además, porque no existe un consenso, tanto en los atlas existentes como en los trabajos publicados, sobre la terminología o nomenclatura empleada para las regiones y subregiones de la CPFm. Sin embargo, diversos autores coinciden en que la CPFm de los roedores presenta similitudes funcionales y anatómicas con las áreas 24, 32 y 25b de Brodmann en humanos, las cuales se corresponden con la subdivisión anatómica de la CPFm en el roedor, con el área del cíngulo anterior (ACa), la región prelímbica (PL) y la región infralímbica (IL), respectivamente (Figura 6) (Wallis, 2012).

La subdivisión de la CPFm en el roedor se debe a la diferencias funcionales y anatómicas que presenta esta corteza a lo largo del eje dorsoventral, basadas en las eferencias que recibe de tálamo dorsal. Los estudios demuestran que el papel que podría tener cada región de la CPFm en la memoria podría depender de diferentes factores, como el tipo de

paradigma (condicionamiento clásico o instrumental), el tipo de memoria (declarativa, no declarativa, espacial), la fase de la memoria e incluso el sexo y tipo de cepa de los animales de experimentación (Chang y Maren, 2010). El condicionamiento clásico, ya sea condicionamiento de miedo al tono o al contexto, ha sido el paradigma más empleado para el estudio de las memorias aversivas o conductas de miedo, y su uso ha permitido distinguir el papel que podría tener cada región de la CPFm en su eje dorsoventral en la adquisición, expresión y extinción de la conducta de miedo (Giustino y Maren, 2015).

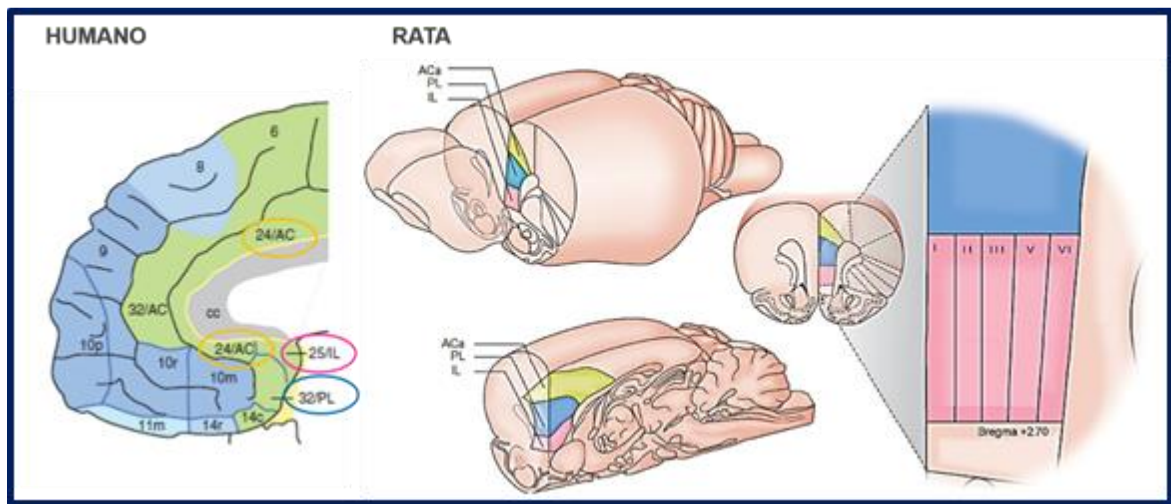


Figura 6. Subdivisión de la CPFm y su correlato con el humano. Representación anatómica que muestra la ubicación del área del cíngulo anterior (ACa), la región prelímbica (PL) e infralímbica (IL) de la CPF medial de la rata y las regiones homólogas del cerebro humano. En función de las características anatómicas y funcionales, las regiones ACa, PL e IL del roedor son aproximadamente análogas a las áreas 24, 32 y 25 de Brodmann, respectivamente. Al igual que la CPF medial del humano, esta región se encuentra dispuesta en capas, con ausencia de la capa granular IV. (Modificado de Wallis, 2012; Tynan et al. 2013).

Por una parte, el ACa se asocia con la fase de adquisición; varios autores han llegado a la conclusión de que su papel en la adquisición de la tarea está en relación con el tipo de información que procesa, pues gracias a la conectividad que presenta con la sustancia gris periacueductal, amígdala basolateral, hipocampo ventral y otras regiones de la CPFm, el ACa podría modular e integrar el componente emotivo y cognitivo del estímulo aversivo, procesos necesarios para la correcta asociación entre estímulos durante la adquisición (Bissière et al., 2008; Tang et al., 2005). Sin embargo, también existen reportes de que esta región podría estar involucrada en la consolidación de la memoria, de acuerdo con Malin y McGaugh

(2006), la estimulación de receptores colinérgicos inmediatamente después del entrenamiento tiene efectos sobre la consolidación de la memoria de EI, mostrando un incremento en la latencia de retención. Como se mencionó, Arc es considerada una de las proteínas esenciales para la plasticidad sináptica y estructural requeridas para la consolidación de la memoria, Zhang y colaboradores (2011) demostraron que el entrenamiento en la tarea de EI provoca un incremento en la expresión de esta proteína en el ACa, y que la administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas provoca un deterioro en la MLP. Otro trabajo que demuestra la importancia de la expresión de Arc para la consolidación de la memoria de EI fue realizado por Holloway y McIntyre (2011a); quienes observaron que la interferencia específica de la expresión de esta proteína, inmediatamente y 6 h después del entrenamiento, provoca un deterioro en la MLP. En conjunto, estos datos dan pie a pensar que el ACa sería un candidato ideal para ser una de las estructuras claves para la consolidación de la memoria de eventos aversivos y no solo para la fase del aprendizaje.

Por otra parte, a las regiones PL (región dorsal de la CPFm) e IL (región más ventral de la CPFm) se les ha asociado con la expresión y la extinción de la conducta de miedo, respectivamente, eventos considerados antagónicos debido a que en el primero se promueve la conducta del miedo y en el otro se inhibe. A pesar de que las dos regiones participan en ambos procesos, se considera que su papel podría ser opuesto y consecuencia de la conectividad que tiene cada región con estructuras asociadas al circuito del miedo, con es la amígdala (Blum et al., 2006; Corcoran y Quirk, 2007; Quirk y Mueller, 2008; Sotres-Bayon y Quirk, 2010; Vidal-Gonzalez et al., 2006). Si bien, ambas regiones reciben aferencias del mismo núcleo basolateral de la amígdala (AMI), estas proyecciones podrían dirigirse a distintas poblaciones neuronales. Además, mientras que la región PL inerva principalmente al núcleo basal lateral, la región IL envía sus proyecciones al núcleo basal medial y al núcleo central de la amígdala, este último considerado como el núcleo de salida para las respuestas de miedo y de alerta debido a sus conexiones con el hipotálamo lateral, al núcleo paraventricular del hipotálamo (PVH, por sus siglas en inglés) y a la sustancia gris periacueductal (Vertes, 2004). Sin embargo, la relación entre la conectividad CPFm-AMI y

su función en los diferentes aspectos de la memoria del condicionamiento al miedo aún no están del todo claros y continúan siendo investigados.

Además del papel que podrían tener las regiones PL e IL en la expresión o extinción de la memoria, existen otros reportes que la vinculan con el proceso de consolidación de la memoria de la tarea de EI, esto mediante la evaluación de la expresión de proteínas relacionadas con la actividad neural y plasticidad sináptica, como c-Fos y Arc, respectivamente; Zhang y colaboradores (2011) reportan un incremento en la expresión de ambas proteínas en las dos regiones, y que la administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas provoca un deterioro en la MLP, sin embargo, en este estudio, la inactivación fue realizada en ambas regiones a la vez, lo que no permite discernir la participación de cada una de ellas en la consolidación. Posteriormente, McReynolds y colaboradores (2014) observaron que la interferencia con la expresión de la proteína Arc en la región PL, inmediatamente del entrenamiento, provoca un deterioro en la consolidación de la memoria de la tarea de EI.

Aunado al papel que tiene la región PL e IL en la memoria, no podemos pasar por alto la relación que tienen estas regiones con la regulación del estrés y la modulación que este ejerce sobre la memoria de eventos aversivos. Al igual que como ocurre en la memoria, el papel que tienen ambas regiones sobre el control del estrés a través del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) aún es discutido, usualmente la estimulación de la región PL se asocia con un bloqueo en la liberación de corticosterona y ACTH (corticotropina) en respuesta al evento estresante, así como déficits en la consolidación de la memoria de la tarea de EI (Garrido et al., mientras que su inactivación o lesión se relacionan con el incremento de estas hormonas. Cuando estas manipulaciones se realizan en la región IL, los efectos sobre el eje HHA resultan contrarios, la inactivación o lesión provoca un incremento en los niveles de corticosterona y déficits en la adquisición de la tarea de EI, por lo tanto, su activación se asocia a un incremento en la respuesta al estrés por parte del eje HHA (Radley et al., 2006). Es importante mencionar que resultados provistos por nuestro laboratorio indican que los niveles de corticosterona en sangre están correlacionados con la intensidad del choque eléctrico en la tarea de EI (González- Franco et al., 2017). Se considera que estos efectos

actúan de manera coordinada y complementaria y están íntimamente relacionados con la conectividad que cada una de las regiones presenta sobre estructuras asociadas a la regulación del eje HHA (Radley, 2012). Además de la amígdala, el hipocampo ventral y el estriado, ambas regiones de la CPFm regulan indirectamente la liberación de las hormonas de estrés, a través de sus proyecciones al núcleo basal de la estría terminal, el cual envía proyecciones GABAérgicas y glutaminérgicas hacia el núcleo PVH, regulando así la liberación de CRH (hormona liberadora de corticotropina), la cual regula la liberación de ACTH en la hipófisis, la ACTH estimula la síntesis y liberación de corticosterona en las glándulas adrenales. Se ha visto que la inactivación de la región PL o de la región IL incrementa o disminuye los niveles de c-Fos en el núcleo PVH, respectivamente (Radley et al., 2006). Además de que ambas regiones presentan una expresión alta de receptores a glucocorticoides, McReynolds y colaboradores (2014), encontraron que la administración sistémica de corticosterona inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de EI provoca facilitación de la MLP y un aumento en la expresión de la proteína Arc en la región PL, por lo tanto, podrían detectar y regular los niveles de corticosterona. En resumen, la región PL regularía de manera negativa la liberación de CORT, mientras que la región IL, tendría una regulación positiva.

Además, también se ha descrito la importancia del sistema dopaminérgico mesolímbico y su relación con la CPFm para la modulación de la memoria de eventos aversivos o estresantes (Abercrombie et al., 1989, González, 2014), siendo el área ventral tegmental (AVT) la principal vía dopaminérgica hacia la CPF y actuando a través de los receptores dopaminérgicos D1/D5. De acuerdo con los trabajos de Gonzalez y colaboradores (2014), la actividad de los receptores D1/D5 en la corteza prefrontal se requieren inmediatamente después del entrenamiento para la persistencia de la MLP de la tarea de EI y de condicionamiento de miedo al sabor, y no para la consolidación de la memoria.

## **2.5. NEURONAS PIRAMIDALES DE LA CPFm, ESPINAS Y MEMORIA**

Estudios recientes han mostrado la presencia de cambios plásticos, reflejados en cambios estructurales y funcionales en las espinas dendríticas de las dendritas basales de la capa III en respuesta a la formación de MLP en el ACa (Restivo et al., 2009), así como en la extinción

de una tarea de condicionamiento al miedo (Vetere et al., 2011). Además, se ha observado que existe un balance entre la formación y eliminación de espinas y que éste determina el cambio en la densidad y tipo de éstas (Chen et al., 2014). En un estudio realizado por Xu y colaboradores (2009), se evaluó la dinámica en el cambio en la forma de la espina dendrítica en la corteza motora al largo del proceso de aprendizaje-memoria en el ratón. Utilizando técnicas de microscopía *in vivo*, se observó la formación de espinas de cabeza pequeña después de la adquisición de una tarea motora, aunque después de esta rápida espinogénesis la densidad de espinas vuelve a su línea basal. En otro estudio donde de igual manera se evaluó la dinámica de las espinas dendríticas después de la retención a largo plazo de condicionamiento de miedo al contexto (Vetere et al., 2011), se observó un aumento significativo en la densidad y el tamaño de las espinas dendríticas apicales de las cortezas IL y ACa al evaluar la memoria de largo plazo. Sin embargo, al evaluar los cambios posteriores a la extinción de la respuesta condicionada la densidad de las espinas regresó a la línea base, pero no la proporción de espinas grandes en la corteza ACa; un resultado opuesto se observó en la corteza IL. La conclusión del estudio fue que las fluctuaciones en la densidad y forma de las espinas dendríticas se producen en estas regiones corticales tanto durante la formación como en la extinción de la memoria de condicionamiento de miedo al contexto.

Es importante recordar que no todas las espinas son susceptibles de eliminación; por ejemplo, espinas de cabeza grande son más estables; correlacionando el tamaño de la cabeza con una mayor fuerza sináptica. Mientras que, espinas recién formadas son más susceptibles a ser eliminadas indicando una menor fuerza en la sinapsis (Fu y Zuo, 2011). La capacidad de aumentar o disminuir la densidad de espinas largas en respuesta a la actividad sináptica ha llevado a la sugerencia de que están involucradas con la adquisición, mientras que la estabilidad de espinas hongo e incremento en espinas cortas sugiere están estrechamente relacionadas con el almacén a largo plazo (Bourne y Harris, 2007; Harris, 1999).

Por otra parte, en un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio, se evaluaron los cambios en la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo dorsal producidos después de la extinción de la memoria de una tarea de evitación inhibitoria utilizando diferentes



intensidades de entrenamiento. Cuando los animales se entrenaron con una intensidad relativamente alta de choque eléctrico se observó una alta resistencia a la extinción, así como una eliminación de espinas en los segmentos proximal y medial, pero no así en el distal, de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo dorsal. Los autores concluyeron que esta eliminación de espinas podría correlacionarse con la extinción de la conducta, mientras que el mantenimiento de las espinas podría ser un mecanismo que media el efecto protector producido por el entrenamiento intenso ante tratamientos amnésicos (Garín-Aguilar et al., 2012).

Estos antecedentes nos indican que la eliminación o formación de espinas dependen del paradigma conductual, la fase de la memoria, y del circuito en que participa. Por lo que el estudio de estas estructuras neuronales nos permitirá entender el efecto del aprendizaje intenso. En particular, nos ayudará a entender parcialmente la participación que tiene la CPFm en la formación de la memoria de EI, así como en las distintas etapas de la memoria. Dado el papel central que desempeñan las neuronas piramidales de la capa III en la conectividad corticocortical y talamocortical y con base en los antecedentes, nos planteamos las siguientes preguntas de investigación:

1. ¿Ocurren cambios en la densidad total y morfología de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la capa III de la corteza media prefrontal después del entrenamiento moderado e intenso de una tarea de EI?
2. ¿Son requeridas cada una de las regiones de la CPFm para la consolidación de la memoria de EI?

---

### **3. HIPOTESIS GENERALES**

---

Para cada una de las subregiones de la CPFm, proponemos las siguientes hipótesis:

1. Se inducirá un incremento en la densidad total de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de la capa III, el cual será dependientes de: a) la fase de la memoria y/o b) la intensidad del entrenamiento.
2. Se inducirá un incremento proporcional de espinas tipo hongo en las neuronas piramidales de la capa III, los cuales serán dependientes de: a) la fase de la memoria y/o b) la intensidad del entrenamiento.
3. La inactivación con TTX inducirá un deterioro en la MLP, dependiente de la intensidad del entrenamiento.

---

### **4. OBJETIVOS GENERALES**

---

1. Determinar si la intensidad del entrenamiento produce cambios en la densidad y morfología neuronal de la CPFm, 6 h y 24 h posteriores al entrenamiento.
2. Determinar el efecto de la inactivación de las distintas regiones de la CPFm sobre la consolidación de memoria de un aprendizaje moderado e intenso.
3. Determinar el efecto de la inactivación de las distintas regiones de la CPFm sobre la consolidación de memoria de un aprendizaje moderado e intenso.

---

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

---

Todos los experimentos realizados fueron realizados en el laboratorio de Aprendizaje y Memoria y aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM, para el uso de animales experimentales y está acorde con la Norma Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y con las normas estipuladas en la “NIH Guide for Care and use of Laboratory Animals” (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011).

En esta sección se describen los procedimientos comunes a todos los experimentos de este estudio. Se describirán otros procedimientos característicos de experimentos particulares cuando corresponda.

### 5.1. SUJETOS

Se utilizaron ratas machos, *Rattus Novergicus* de la cepa Wistar, con un peso de entre 300-350 g. Los sujetos se obtuvieron de la colonia de producción del bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se alojaron de manera individual en cajas de acrílico transparente con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Se mantuvieron en el bioterio del laboratorio con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h /12 h (comenzando a las 7:00 h). La temperatura del bioterio fue de  $23 \pm 1$  ° C. Las ratas se asignaron de manera aleatoria a cada grupo. Los procedimientos conductuales se realizaron durante la fase de luz del ciclo, entre las 8:00 a.m. y las 12:00 p.m.

### 5.2. MANIPULACIÓN

Dentro de los 7 días de reposo posoperatorio y/o antes del inicio de los procedimientos conductuales, se realizó la manipulación de los sujetos con el fin de habituarlos al investigador y al proceso de infusión de los fármacos. La manipulación se realizó en el cuarto de inyecciones del Laboratorio de Aprendizaje y Memoria y consistió en sacar a la rata de su caja, pesarla, retirar los tapones, revisar que las cánulas tuvieran libre acceso y sujetar a la

rata. El procedimiento se realizó en sesiones de 5 minutos durante 3 días consecutivos previos a la administración de los fármacos. Para el caso de los sujetos con cánulas implantadas, en la última sesión se le colocó un inyector falso (que sobresalía 1 mm de la punta de la cánula) y se simuló el procedimiento realizado para la infusión de los fármacos.

### **5.3. PROCEDIMIENTOS CONDUCTUALES**

#### **5.3.1 EVITACIÓN INHIBITORIA**

El entrenamiento y la prueba se realizaron en un aparato diseñado de manera específica para estudiar el aprendizaje de EI de un solo ensayo. Consiste en una cámara compuesta por dos compartimientos de acrílico transparente de color rojo (30 x 30 x 30 cm cada uno), separados por una puerta tipo guillotina. El compartimento de seguridad estuvo iluminado por un foco incandescente de 10 W localizado en el centro de su tapa, el piso está hecho con barras de acero inoxidable de 6 mm de diámetro y separadas una de otra cada 9 mm. El otro compartimento no iluminado, denominado “de castigo”, tiene paredes de acero inoxidable que forman una “V” hacia el centro del piso, entre las cuales hay 1.5 cm de separación, mismas que pueden ser electrificadas ya que están conectadas a un estimulador que genera pulsos cuadrados (Grass Instruments Co., modelo S-48), conectado a una unidad de corriente constante (Grass Instruments Co., modelo CCU-1A). La duración de los estímulos, las latencias de entrada, de salida y de retención, que se definirán en las siguientes secciones, se midieron con un sistema automatizado. Ambos compartimentos se limpiaron con alcohol en concentración del 10% antes y después de que fuera colocada cada rata. La cámara de condicionamiento se ubió en un cuarto sonoamortiguado (2.45 X 1.95 X 2.50 m) y oscuro, provisto de una fuente de ruido blanco de fondo (BRS/LVE AU-902).

#### **5.3.2 SESIÓN DE ENTRENAMIENTO**

El día del entrenamiento cada animal se colocó dentro del compartimento de seguridad; 10 s después la puerta, localizada entre los dos compartimentos, se abrió y se midió el tiempo que tardó en cruzar al compartimento de castigo (latencia de entrada). Cuando los animales

cruzaron a este compartimento la puerta se cerró y se administró un choque eléctrico de 1.0 o 3.0 mA (un tren de pulsos cuadrados de 50 ms a 10 Hz). Cinco segundos después la puerta se abrió permitiendo al animal escapar al compartimiento de inicio apagándose entonces el estimulador. Se registró el tiempo que tardó en salir del compartimiento de castigo y pasar al de seguridad (latencia de escape). Después de 30 segundos de permanencia en el compartimiento de inicio, el animal se regresó a su caja-habitación.

### **5.3.3. SESIÓN DE PRUEBA DE RETENCIÓN Y DE EXTINCIÓN**

En la sesión de prueba de retención se siguió el mismo protocolo de entrenamiento, excepto que no se administró el choque eléctrico. Se registró el tiempo que el animal tardó en pasar del compartimiento de seguridad al de castigo (latencia de retención). Si el animal no cruzaba al segundo compartimento en 600 segundos, la sesión se dio por terminada y se le asignó una latencia de retención de 600 segundos. La prueba de retención se realizó a los 30 minutos y/o a las 48 horas después del entrenamiento, dependiendo del protocolo experimental. La evaluación de la extinción de la memoria de EI se inició 24 h después del entrenamiento. se siguió el mismo protocolo de la sesión de prueba de retención y consistió en una sesión diaria en seis días consecutivos.

## **5.4. DENSIDAD Y MORFOLOGÍA DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS DE LA CPFm DESPUÉS DEL ENTRENAMIENTO EN LA TAREA DE EI**

### **5.4.1. ESQUEMA DE TRABAJO**

Para cumplir con los objetivos propuestos se realizaron los siguientes experimentos:

**Experimento 1.** Evaluación de la densidad y morfología de las espinas dendríticas 6 h después del entrenamiento (consolidación).

**Experimento 2.** Evaluación de la densidad y morfología de las espinas dendríticas 24 h después del entrenamiento (memoria de largo plazo).

Para cada experimento, los animales se asignaron de manera aleatoria a los siguientes grupos:

- Grupo control bioterio, sin entrenamiento (BIO). Para determinar el nivel basal de la densidad de espinas.
- Grupo control de solo choque, al que se le administró un choque eléctrico de 3.0 mA en el compartimento oscuro, sin ser entrenado (SCh 3.0 mA). Para determinar si el choque por sí mismo induce modificaciones en las espinas dendríticas.
- Grupo control sin choque, sometido al protocolo de entrenamiento, pero no se le aplicó el choque eléctrico (0.0 mA). Para determinar si la exposición al contexto de entrenamiento induce modificaciones en las espinas dendríticas.
- Grupo entrenado en la tarea de EI con un choque de 1.0 mA, entrenamiento moderado.
- Grupo entrenado en la tarea de EI con un choque de 3.0 mA, entrenamiento intenso.

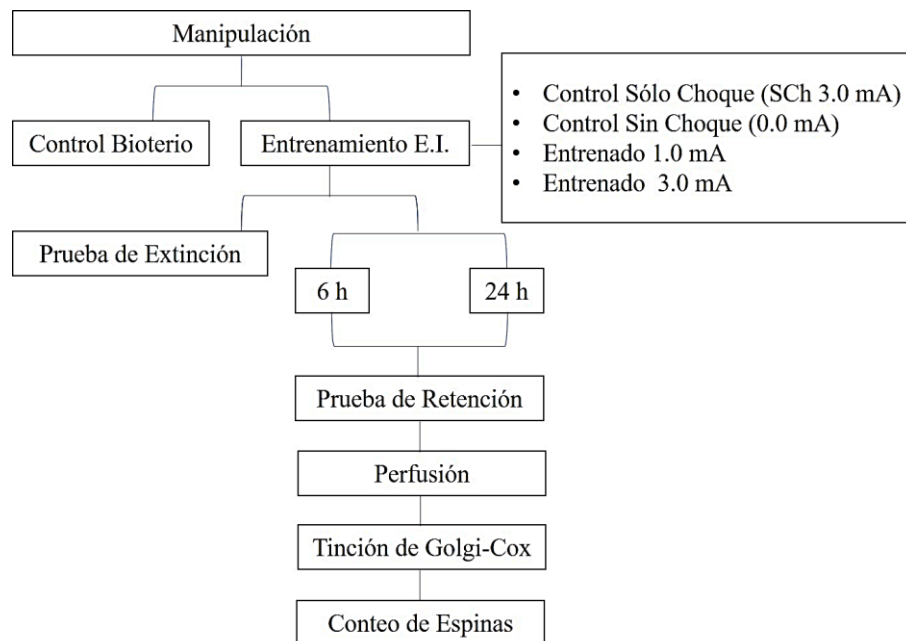


Figura 7. Diagrama del diseño experimental I.

La mitad de los sujetos de los grupos entrenados con 0.0, 1.0 y 3.0 mA, se les midió la retención en seis sesiones consecutivas (prueba de extinción), adicionales a la primera prueba de retención. Era de esperarse que los animales que entrenados con 3.0 mA mostraran

una mayor resistencia a la extinción (es decir, tendrán latencias de retención significativamente mayores que los entrenados con 1.0 mA). De esta manera, se comprobaría que el entrenamiento con 1.0 mA es moderado con respecto al de 3.0 mA, que es intenso.

#### **5.4.2. OBTENCION DE LAS MUESTRAS**

Al término de las pruebas conductuales y de acuerdo con el diseño experimental, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (125 mg/kg, ip), posteriormente se perfundieron por vía intraventricular con solución salina isotónica (NaCl, 0.9 %) con la finalidad de remover las células sanguíneas del tejido cerebral, se extrajo el cerebro y se procedió a la impregnación argéntica de Golgi-Cox (Robinson y Kolb, 1997).

#### **5.4.3 TÉCNICA DE GOLGI-COX**

Los cerebros se fijaron e impregnaron en la solución de Golgi- Cox (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 170 mM, HgCl<sub>2</sub> 200 mM, K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> 200 mM), durante 30 días, se realizó un cambio de la solución cada semana. Posteriormente, se sustituyó la solución de Golgi-Cox por solución de sacarosa al 30 % y se mantuvieron en esta durante 3 días [34]. Pasado este tiempo, se realizaron los cortes coronales de 200 µm al nivel de CPF con un vibratomo (Camden Instrument, MA752). Los cortes se colocaron en laminillas previamente gelatinizadas (2%). El tejido fue revelado con hidróxido de amonio (30 min), y se diferenciaron en el revelador Kodak (30 min) se lavaron con agua, se deshidrataron con alcoholes y se aclararon con xileno; finalmente se montaron con resina sintética. Cada laminilla se etiquetó con un número aleatorio con el fin de hacer el análisis morfológico en ciego.

#### **5.4.5. CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LAS ESPINAS DENDRÍCAS**

La cuantificación de las espinas dendríticas se realizó con ayuda de un microscopio óptico Optiphot-2 Nikon, con el objetivo de 100x (Plan-Apochromat, NA 0.8) y aceite de inmersión,

el objetivo tenía acoplada una retícula calibrada en el objetivo. Se ubicaron y analizaron las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la capa III de la región IL, PL y del ACa de la CPFm. Estas neuronas debieron presentar las siguientes características: soma triangular característico (25-30  $\mu\text{m}$  de diámetro), árbol dendrítico apical que se extiende hasta la capa I de la corteza., presencia de 5-20 dendritas basilares que se extienden hacia el interior de la corteza. Una vez localizada la neurona, se eligió al azar una dendrita basal de segundo orden que estuviera a 100  $\mu\text{m}$  de distancia del soma. De la dendrita seleccionada se hizo la cuantificación de las espinas que quedaran dentro de un rango de 30  $\mu\text{m}$  de longitud de acuerdo con el método de Flores y colaboradores (2005), además de la cuantificación, las neuronas se tipificaron cualitativamente, de acuerdo con su morfología, en hongo, delgada, corta y bifurcada; estas se han clasificado usando criterios como la longitud, el tamaño del cuello y el diámetro y forma de la cabeza. La densidad de espinas dendríticas se calculó como el promedio del número de espinas dendríticas en 30  $\mu\text{m}$  de longitud.

## **5.5. INACTIVACIÓN TEMPORAL DE CADA REGIÓN DE LA CPFm**

### **5.5.1 DIAGRAMA DE TRABAJO**

### **5.5.2. CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA**

Para los sujetos destinados a implantación de cánulas se realizó la cirugía estereotáxica: Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg, ip), combinado con atropina (1 mg/kg, ip) para prevenir la obstrucción del tracto respiratorio. Se colocaron en el aparato estereotáxico (Stoelting, Co., EEUU) con fin de realizar la inserción de cánulas esmeriladas fabricadas con tubo de acero inoxidable (longitud: 8 mm para ACa y 10 mm para PL e IL; calibre 23). Las cánulas se insertaron de manera bilateral en las siguientes coordenadas de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (2007): en la región ACa (AP+2.8 mm de bregma, ML  $\pm 0.4$  mm de la línea media y DV -1.4 mm a partir de la superficie del cráneo), en la región PL (AP +3.0 mm, ML  $\pm 0.7$  mm y DV -3.2 mm) o en IL (AP +3.0 mm, ML  $\pm 0.6$  mm y DV -4.2 mm). Se hizo una incisión en la piel en la línea media y después se realizó un trépano con un diámetro de 1 mm en el cráneo bajo las coordenadas correspondientes para colocar las



cánulas, estas se anclaron al hueso con la ayuda de un tornillo y con cemento dental. A cada cánula se le insertó un tapón (8 mm de largo para ACa y 10 mm de largo para PL e IL) con el fin de evitar la obstrucción de la cánula. Inmediatamente después de la cirugía las ratas se colocaron en una incubadora hasta su recuperación de la anestesia, posteriormente fueron colocadas en su caja-hogar. Los sujetos de experimentación permanecieron en reposo post-operatorio durante siete días, antes de cualquier procedimiento conductual.

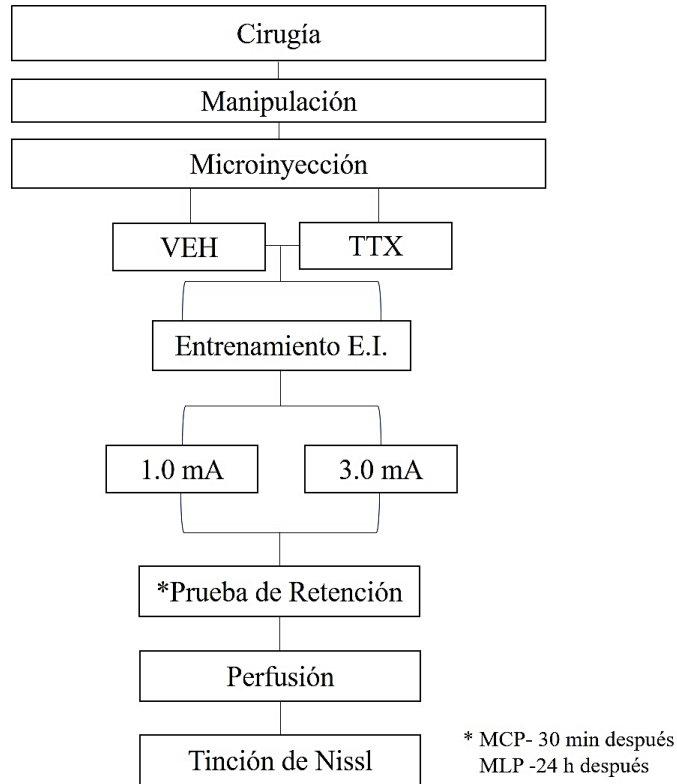


Figura 8. Diagrama del diseño experimental II.

### 5.5.3. INFUSIÓN DE LOS FÁRMACOS

La administración de TTX (Sigma, C11H17N3O8, T8024; 0.3  $\mu\text{g}$ /hemisferio, disuelta en 0.3  $\mu\text{L}$  de solución salina) o un volumen igual de vehículo (VEH) se realizó en el cuarto de

inyecciones, la infusión se realizó manera simultánea en ambos hemisferios con una bomba de microinfusión lenta (World Precision Instruments Inc., modelo sp200i, E.U.A.) acoplada a dos microjeringas Hamilton de 10  $\mu$ l, cada una conectada a través de un tubo de polietileno calibre PE-20 a un inyector (que sobresalía 1 mm de la punta de la cánula), fabricado con un tubo de aguja hipodérmica de acero inoxidable del número 30. La velocidad de infusión fue de 0.3  $\mu$ l/min y el microinyector permaneció dentro de la cánula durante un minuto adicional para permitir una mejor difusión. La infusión se realizó en la región del ACa, PL o IL 25 min antes del entrenamiento.

Para la evaluación de dependencia de estado la administración se realizó 25 min antes de la sesión del entrenamiento y de la sesión de prueba. En caso de que se compruebe dependencia de estado, la administración se realiza inmediatamente después del entrenamiento en la región IL.

#### **5.5.4. ANÁLISIS HISTOLÓGICO**

Al término de las pruebas conductuales los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (125 mg/kg, ip), posteriormente se perfundieron por vía intraventricular con solución salina isotónica (NaCl, 0.9 %) con la finalidad de remover las células sanguíneas del tejido cerebral, para fijar el tejido, se perfundieron con formalina al 4 %. Se extrajo el cerebro, y se realizaron cortes coronales de 50  $\mu$ m de grosor y se tiñeron con la técnica de Nissl. Finalmente, los cortes se observaron al microscopio (Leica S6E L2, Alemania). Para determinar si ambas puntas del inyector se encontraban en la zona deseada, nos guiamos con el Atlas de Paxinos (2005) y se descartaron del experimento a los sujetos que las tuvieran fuera de la zona de interés.

#### **5.5.5. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA c-FOS**

Para evaluar el efecto bloqueador de la TTX sobre la actividad neural de cada una de las tres regiones de la CPFm, se utilizó la técnica inmunohistoquímica para detección de la proteína c-Fos, proteína comúnmente empleada como marcador de actividad neuronal (Herrera y Robertson, 1996; Sagar, Sharp, y Curran, 1988; Willoughby, Mackenzie, Medvedev, y

Hiscock, 1997) (Sagar et al., 1988; Herrera and Robertson, 1996; Willoughby et al., 1997). Para ello, por cada región de interés se entrenó un grupo de ratas con 1,0 o 3,0 mA, la mitad del grupo se trató con TTX o VEH, como se describió anteriormente, pero no se midió la retención de la tarea. También contamos con un grupo control intacto (n=6) para obtener el número basal de células c-Fos-positivas, el cual se mantuvo en condiciones idénticas a las del resto de los grupos, pero nunca abandonaron el bioterio, excepto para su sacrificio.

### **Obtención y preparación del tejido**

Una hora después del entrenamiento, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (125 mg/kg, i.p.) y perfundidas intraventricularmente con solución salina isotónica, seguida de 500 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% (pH 9.5, 10°C). Se extrajeron los cerebros y almacenados durante 4 horas en PFA al 4% (4°C), posteriormente en una solución de 15% de sacarosa en solución amortiguadora (PBS, 0.1 M) durante 12 horas (4°C), a continuación, se almacenaron por 3 días en sacarosa al 30% (PBS, 0.1 M, 4°C). Posteriormente los cerebros se cortaron en cuatro series coronales de 30 µm de espesor, obteniendo las regiones IL, PL y Aca, las cuales fueron colectadas y almacenados a -20°C en solución anticongelante (30% etilenglicol y 20% glicerol en PBS, 0.05 M).

### **Inmunohistoquímica**

Los cortes de cerebro se aclararon con PB (0.1 M, 20 min) tanto al inicio para eliminar la solución anticongelante, como entre cada reacción del proceso. Para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena y evitar una reacción inespecífica, las secciones fueron incubadas en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.03%, en PB 0.1 M, 10 min). Con el fin de reducir la presencia de grupos aldehídos que se acumulan por el proceso de fijación del cerebro y que pueden interferir con la especificidad de reacción del anticuerpo primario, las secciones se incubaron en solución de NaBH<sub>4</sub> (1%, 6 min). Previo a la incubación con el anticuerpo primario, se bloquearon las uniones inespecíficas con NGS (3%, 15 min). Las secciones fueron incubadas en anticuerpo primario policlonal de conejo contra c-Fos (1:5000, Abcam, Cambridge, MA, EE. UU., 4°C, 48 h). Posteriormente se incubaron 1 hora con el anticuerpo secundario biotinilado de cabra anti-conejo (BA-1000, 1:500; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU). El anticuerpo

primario fue detectado con la técnica del complejo avidina-biotina-peroxidasa, incubando 1 hora con la solución avidina-peroxidasa del kit de revelado ABC Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU) y con solución de diaminobenzidina (0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NAS, 4°C, 10 min). Esta solución produce una reacción de precipitación de níquel sobre el complejo avidina-biotina y revela el sitio donde se encuentra la proteína c-Fos. Finalmente se colectaron los cortes en laminillas silanizadas, se incubaron 12 horas en una estufa a 37°C, se deshidrataron con alcohol a concentraciones decrecientes, se aclararon con xileno y se cubrieron con Entellan ®.

### **Cuantificación de las células positivas a c-Fos**

Se obtuvieron imágenes digitales con un microscopio Leica AF6000 (Leica, Alemania), usando un objetivo a 10x. Se realizó un conteo automático de las células positivas a c-Fos mediante el software ImageJ (NIH). Se utilizó un complemento del programa (plug-in: “cell counter”) y se posicionaron 3 cuadros (100 µm x 100 µm) de manera horizontal y centradas 100 µm por debajo de la punta del inyector, esto se hizo de manera bilateral, por lo tanto, se obtuvieron y analizaron seis imágenes por sujeto.

Debido a que el ACa, la región PL e IL están uno al lado de la otra a lo largo del eje dorsal-ventral, fue importante evaluar la posibilidad de que la TTX haya tenido un efecto sobre la memoria debido a su difusión en la región de interés y a las regiones vecinas. Por ello, se realizó el conteo descrito previamente, pero 600 µm por debajo del sitio de inyección del grupo canulado en la región PL. El nivel de expresión de la proteína c-Fos en cada región del cerebro para cada grupo se expresó como la relación del promedio de células positivas a c-Fos de cada rata para cada grupo dividido por el promedio de células positivas a c-Fos del grupo intacto.

### **5.5.6. CUANTIFICACIÓN DE CORTICOSTERONA**

Como pudo observarse, los sujetos tratados con TTX en la región IL mostraron bajas latencias de retención en ambas condiciones de entrenamiento (1.0 y 3.0 mA) y considerando los estudios previos que sugieren que la región IL de la CPFm regula los niveles de la corticosterona (CORT) bajo circunstancias estresantes (Radley, Arias, y Sawchenko, 2006),

se evaluó el efecto de la inactivación de IL sobre los niveles plasmáticos de CORT después del entrenamiento. Esta cuantificación se obtuvo de grupos tratados con TTX o VEH en la región IL y entrenados con 1.0 (n=6, 7; para VEH y TTX respectivamente) o 3.0 mA (n=5, 4; para VEH y TTX respectivamente), tal como se describió anteriormente, pero no se midió la retención de la tarea. También contamos con un grupo control intacto (n=6) para obtener los niveles basales de corticosterona y un grupo que recibió solo choque en las patas para observar los niveles de corticosterona debido al estímulo nocivo (n=5).

Quince minutos después del entrenamiento, se obtuvieron muestras de sangre (3 ml) de los sujetos. Las muestras se recogieron en tubos de ensayo y se centrifugaron (2000 rpm, 30 min, 4 ° C), se obtuvo el sobrenadante y se centrifugó (250 rpm, 10 min, 4 ° C); el suero se almacenó a -80 ° C hasta el momento del ensayo. La CORT se midió sin extracción con un kit ELISA comercial (ENZO LIFE SCIENCE INT'L INC., Pennsylvania, EUA), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Para la lectura de la densidad óptica se utilizó un lector de absorbancia de microplacas (iMark, BIO-RAD, EUA) a 405 nm, con una corrección de entre 570-590 nm. El anticuerpo presenta reactividad cruzada con corticosterona (100 %), deoxicorticosterona (28.6 %) y progesterona (1.7 %), así como con otros compuestos (<1 %).

## **5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se evaluó si los datos cumplían o no con los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas mediante las pruebas D'Agostino y Pearson y de Bartlett, respectivamente. Debido al punto de corte arbitrario impuesto a la latencia de retención (600 s), los datos derivados de las pruebas de retención no se distribuyeron de forma normal. Por esta razón se utilizó estadística no paramétrica para el análisis de los datos. Se realizaron análisis independientes para las latencias de adquisición, escape y retención, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Cuando fue apropiado, se usó la prueba U de Mann-Whitney para comparar la ejecución entre pares de grupos ( $p < 0.05$  considerado significativo). Para estudiar las latencias de retención de las siete sesiones de extinción de cada grupo, se utilizó una prueba de medidas repetidas de Friedman. Para comparar las latencias de cada nivel de entrenamiento por día y para

comparar las latencias entre pares de días, se utilizó como prueba post-hoc la prueba de rangos de Wilcoxon. Los datos se presentan como medianas  $\pm$  sus rangos intercuartilares.

Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para analizar la densidad y el tipo de espinas. Para observar las diferencias significativas entre pares de grupos, se usó la prueba de comparaciones múltiples de Dunn, para detectar posibles diferencias entre cada par de grupos. Se hicieron dos mediciones relacionadas con las espinas: la densidad total de espinas que quedaron dentro del rango de 30  $\mu\text{m}$  de longitud descrito anteriormente, y la proporción relativa de cada uno de los tipos de espina (razón del número de espinas/número total de todos los tipos de espinas en el rango de 30  $\mu\text{m}$  de longitud).

Del mismo modo, los recuentos de células positivas para c-Fos en grupos TTX y VEH en cada región de mPFC se compararon con la prueba U de Mann-Whitney. Para el caso de los niveles de CORT, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para cada condición de entrenamiento. Cuando fue apropiado, se usó la prueba de comparaciones múltiples de Dunn para hacer comparaciones entre grupos.

---

## 6. RESULTADOS

---

### 6.1. DENSIDAD Y MORFOLOGÍA DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS DE LA CPFm DESPUÉS DEL ENTRENAMIENTO EN LA TAREA DE EI

#### 6.1.1. RESULTADOS CONDUCTUALES

**Latencias de entrada y de escape.** En la sesión de entrenamiento se obtuvieron las latencias de entrada y las latencias de salida, mostradas en la figura 9. No se observaron diferencias significativas entre los grupos de 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA ( $n=15/\text{grupo}$ ) en las latencias de entrada, tanto en grupos asignados al Experimento 1 (6 h), como en los asignados al Experimento 2 (24 h) [ $H= 2.812$ ,  $p = 0.2451$  y  $H= 5.801$ ,  $p = 0.0550$ , respectivamente]. Para el caso de las latencias de salida, se observaron diferencias significativas entre los grupos, tanto en el experimento de 6 h, como en el experimento de 24 h [ $H= 29.37$ ,  $p = 0.0001$ ] y  $H= 28.27$   $p = 0.0001$ ]. Para ambos casos (6 y 24 h), las diferencias se encontraron entre los grupos de 0.0 mA vs 1.0 mA y 0.0 mA vs 3.0 mA ( $p<0.0001$ ), y no se encontraron diferencias entre los grupos de 1.0 mA vs 3.0 mA ( $p>0.05$ ).

**Latencias de Retención.** Las latencias de retención se obtuvieron 6 o 24 h después del entrenamiento, en ambos casos se observaron diferencias significativas entre los grupos de 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA [ $H=37.50$ ,  $p = 0.0001$  y  $H= 70.12$ ,  $p = 0.0001$ , respectivamente], obteniendo mayores latencias de retención en los grupos entrenados con choque eléctrico. La prueba U de Mann-Whitney mostró que, para ambos casos (6 y 24 h), las diferencias se encontraron entre los grupos de 0.0 mA vs 1.0 mA y 0.0 mA vs 3.0 mA ( $p=0.0001$ ), y no se encontraron diferencias entre los grupos de 1.0 mA vs 3.0 mA ( $p>0.05$ ).

Con el fin de comprobar si la conducta varía en función del tiempo en que fueron probados, se comparó cada par de grupo (0.0 mA, 1.0 mA o 3.0 mA) en los dos tiempos diferentes (6 h o 24 h). Mediante la prueba U de Mann Whitney se demostró que no hubo diferencias entre ninguna comparación ( $p's > 0.05$ )

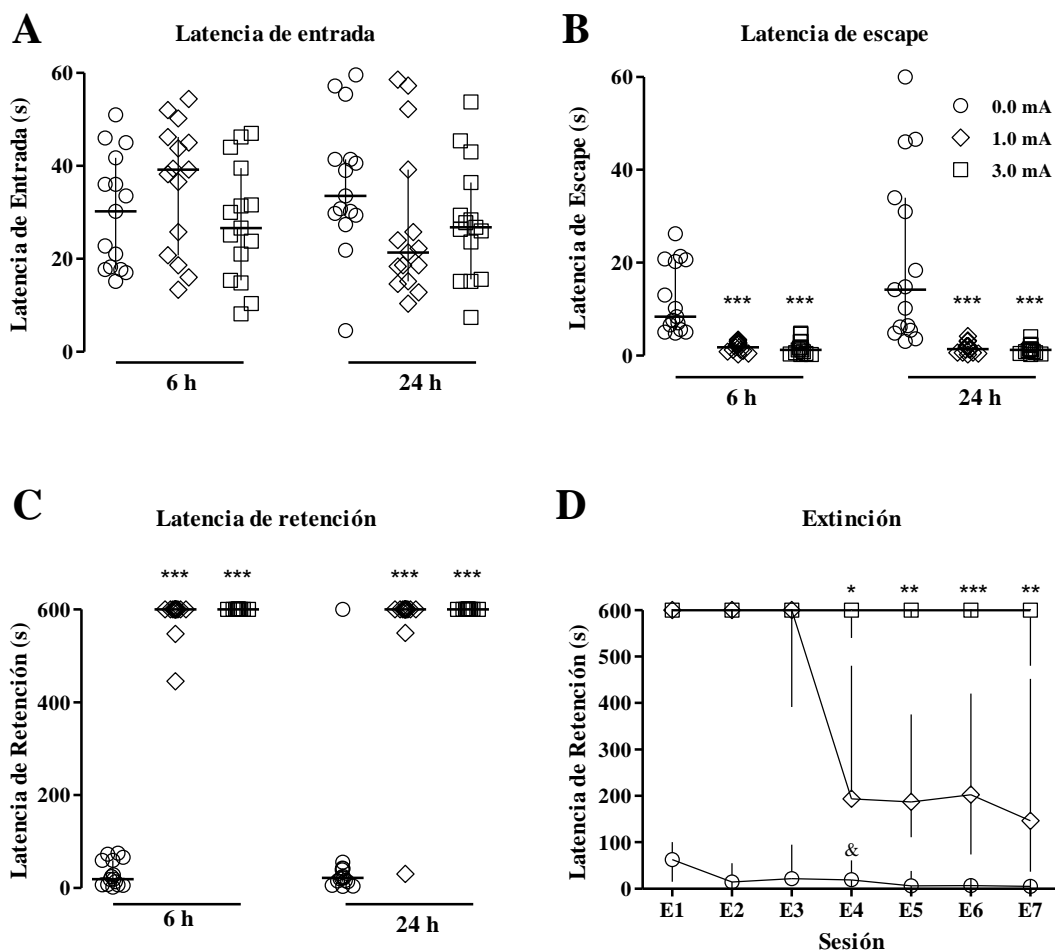


Figura 9. Resultados conductuales en la tarea de evitación inhibitoria. A. Latencia de entrada. B. Latencia de escape. C. Latencia de retención cuantificada 6 h o 24 h después del entrenamiento. \*\*\*  $p < 0.0001$  vs el grupo 0.0 mA ( $n=15$ /grupo). D. Latencia de retención a lo largo de las diferentes sesiones de extinción (E1- E7) en grupos entrenados sin choque 0.0 mA ( $n=5$ ) o con choque de 1.0 mA ( $n=7$ ) o 3.0 mA ( $n=8$ ) en la tarea de evitación inhibitoria. Los cuadrados, círculos y rombos en esta y en las siguientes figuras representan los datos de ratas individuales \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.0001$  1.0 mA vs 3.0 mA. &  $p < 0.05$  vs E1. Todas las mediciones se muestran en medianas con rangos intercuantiles.

**Prueba de extinción.** Con esta prueba se pudo demostrar las diferencias entre el entrenamiento moderado (1.0 mA) y el entrenamiento intenso (3.0 mA) sobre el aprendizaje de la tarea, corroborando así, que el entrenamiento intenso produce una resistencia a la extinción. En la figura 9D se observan las latencias de retención obtenidas a lo largo de las siete sesiones de extinción para los grupos de 0.0 mA ( $n= 5$ ), 1.0 mA ( $n= 7$ ) y 3.0 mA ( $n =$



8). El estadístico de prueba no mostró diferencias significativas entre las siete sesiones en el grupo de 0.0 mA [ $X^2(6) = 15.77$ ,  $p = 0.150$ ] y tampoco en el de 3.0 mA [ $X^2(6) = 15.77$ ,  $p = 0.150$ ]. Para los grupos entrenados con 1.0 mA [ $X^2(6) = 27.15$ ,  $p = 0.0001$ ] sí se encontraron diferencias significativas entre las siete sesiones. Para el caso del grupo entrenado con 1.0 mA, la prueba de Wilcoxon mostró que a partir de la cuarta sesión (E4) hasta la última sesión (E7), la latencia de retención disminuyó significativamente en comparación con la sesión 1 (E1) ( $p$ 's  $< 0.05$ ). El análisis por sesión entre cada uno de los grupos mostró diferencias significativas entre ellos en la sesión E1 [ $H = 14.77$ ,  $p = 0.0006$ ]. La prueba U de Mann-Whitney reveló diferencias significativas entre los grupos 0.0 mA y 1.0 mA ( $p = 0.0025$ ) y entre los grupos 0.0 mA y 3.0 mA ( $p = 0.0016$ ), no hubo diferencias entre los grupos 1.0 mA y 3.0 mA ( $p = 1$ ). En las sesiones de extinción E2, E3, E4, E5 y E6 todos los grupos difieren entre sí ( $p$ 's  $< 0.05$  a  $< 0.001$ ). En la sesión E4, E5, E6 y E7 la prueba U de Mann-Whitney mostró que la latencia de retención entre los grupos 0.0 mA y 1.0 mA fue significativamente diferente ( $p$ 's  $< 0.05$  a  $< 0.001$ ), lo mismo se observa entre el grupo 0.0 mA y 3.0 mA ( $p$ 's  $< 0.05$  a  $< 0.001$ ), sin embargo, al comparar los grupos 1.0 mA y 3.0 mA se observó una diferencia significativa ( $p$ 's  $< 0.05$  a  $< 0.001$ ), el grupo de 1.0 mA tuvo una menor latencia de retención que el grupo 3.0 mA.

## 6.2. RESULTADOS HISTOLOGICOS DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS

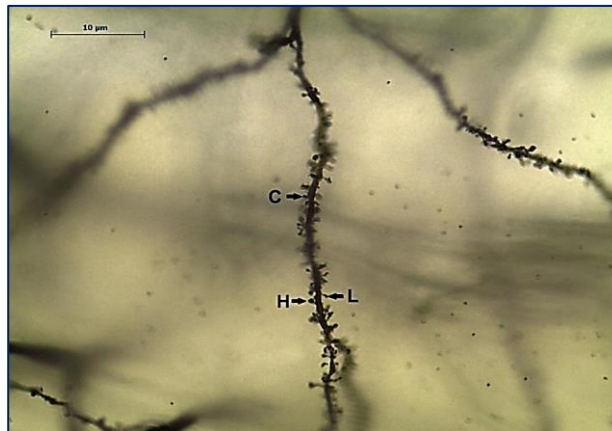


Figura 10. Fotomicrografía de una dendrita basal de una neurona piramidal capa II-II, de la CPFm. Tipos de espinas: c, corta; L, larga y H hongo.

### 6.2.1. ÁREA DEL CÍNGULO ANTERIOR

**Densidad total.** Debido a que los datos no cumplieron con el criterio de normalidad, se aplicó estadística no paramétrica para cada experimento (6 h y 24 h). En la cuantificación del número de espinas encontradas a lo largo de 30  $\mu\text{m}$  de la dendrita (densidad total), la prueba de Kruskal- Wallis reveló que no existen diferencias significativas entre los grupos BIO, SCH, 0.0, 1.0 mA y 3.0 mA asignados para el experimento de 6 h [ $H(4) = 1.025$ ,  $p = 0.9$ ], lo mismo se observó entre los grupos asignados al experimento de 24 h [ $H(4) = 3.48$ ,  $p = 0.48$ , respectivamente] (Fig. 11A)

**Cuantificación por tipo de espina.** Las espinas cuantificadas para determinar la densidad total se clasificaron cualitativamente de acuerdo con su forma en: espinas de tipo corta, delgada y hongo. Se obtuvo la proporción de cada tipo de espinas con respecto al total de espinas.

**Espinas tipo corta.** No se encontraron diferencias significativas en la proporción de las espinas tipo corta en el experimento de 6 h ni en el experimento de 24 h [ $H(4) = 8.73$ ,  $p = 0.06$  y  $H(4) = 1.34$ ,  $p = 0.86$ , respectivamente] (Fig. 11B).

**Espinas tipo larga.** Se encontraron diferencias significativas en la proporción de espinas dendríticas tipo larga entre los grupos en el experimento de 6 h [ $H(4) = 13.02$ ,  $p = 0.011$ ]. El análisis de comparaciones múltiples de Dunn mostró que existe una menor proporción de espinas dendríticas tipo larga en el grupo entrenado con 3.0 mA en comparación con el grupo control SCH ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones entre el resto de los grupos no mostraron diferencias significativas ( $p's > 0.05$ ). Cuando se evaluó la proporción de espinas tipo larga entre los grupos asignados al experimento de 24 h, también se encontraron diferencias entre ellos [ $H(4) = 12.31$ ,  $p = 0.0152$ ]. Se encontró que el grupo entrenado con 3.0 mA muestra una disminución significativa en este tipo de espina en comparación con el grupo control BIO ( $p < 0.05$ ). El resto de los grupos no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p's > 0.05$ ) (Fig. 11C).

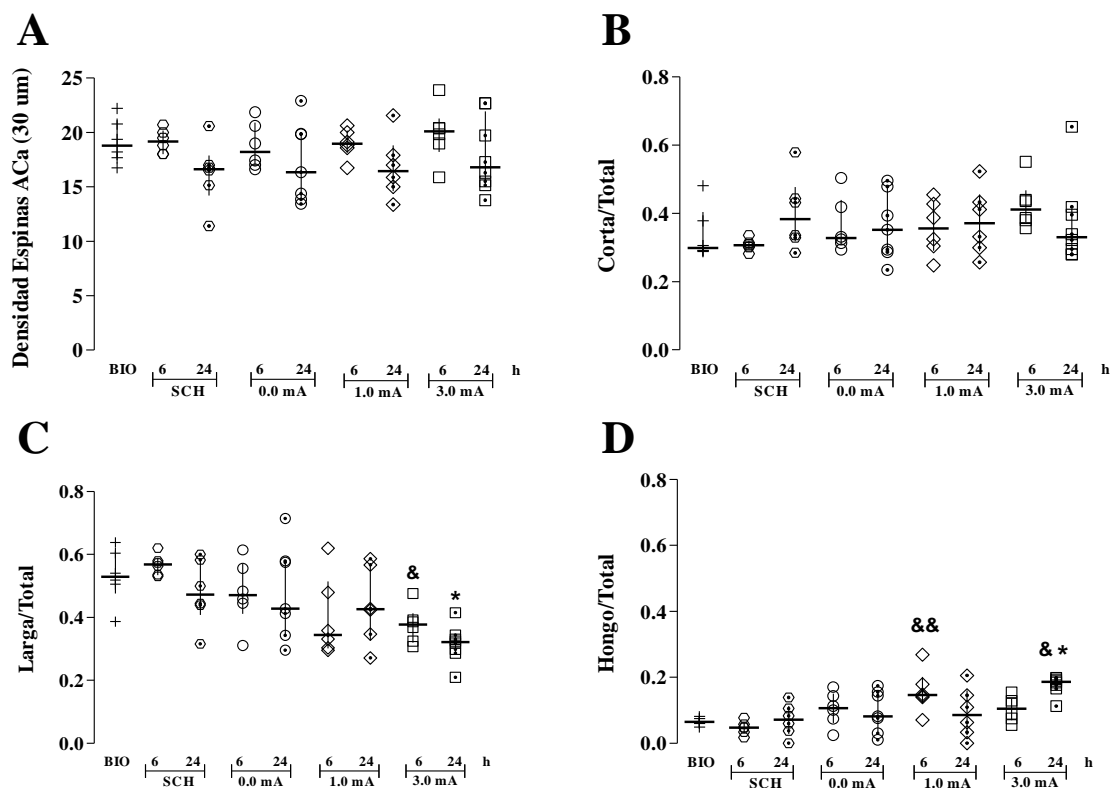


Figura 11. Resultados de la cuantificación y análisis morfológico de las espinas dendríticas en Aca. A. Densidad total. B. Proporción de espinas tipo corta. C. Proporción de espinas tipo larga. D. Proporción de espinas tipo hongo. \*  $p < 0.05$  vs BIO. &  $p < 0.05$ , &&  $p < 0.01$  vs SCH. Todas las mediciones se muestran en medianas con rangos intercuartiles.

**Espinas tipo hongo.** Se encontraron diferencias significativas en la proporción de espinas dendríticas tipo hongo entre los grupos en el experimento de 6 h [ $H(4) = 14.66$ ,  $p = 0.005$ ]. El análisis de comparaciones múltiples de Dunn mostró que existe una mayor proporción de espinas dendríticas tipo hongo en el grupo entrenado con 1.0 mA en comparación con el grupo control SCH ( $p < 0.01$ ). Las comparaciones entre el resto de los grupos no mostraron diferencias significativas ( $p$ 's  $> 0.05$ ). También se encontraron diferencias entre los grupos asignados al experimento de 24 h, cuando se evaluó la proporción de espinas tipo hongo [ $H(4) = 14.09$ ,  $p = 0.079$ ]. Se encontró que el grupo entrenado con 3.0 mA muestra una mayor proporción que resulta significativa en este tipo de espina en comparación con los grupos

control BIO y SCH ( $p < 0.05$ ). El resto de los grupos no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p$ 's  $> 0.05$ ) (Fig. 11D).

En la Figura 12 se muestra la proporción de tipo de espinas corta, larga y hongo encontradas a lo largo de  $30 \mu\text{m}$  de longitud de la dendrita del ACa. Sólo se muestran el tipo de espinas de interés para este trabajo.

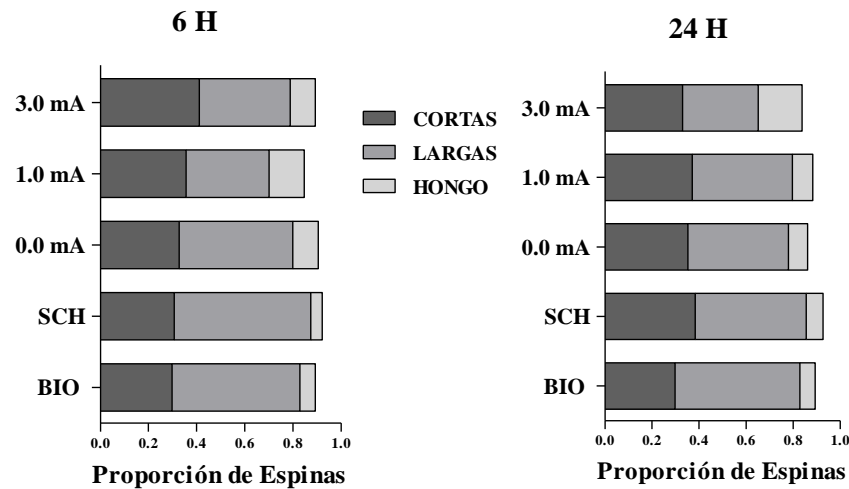


Figura 12. Representación gráfica de la proporción de espinas cortas, largas y hongo encontradas en cada grupo de interés evaluado 6 h y 24 horas después del entrenamiento en ACa.

### 6.2.2. REGIÓN PRELÍMBICA

**Densidad total.** En la cuantificación del número de espinas encontradas a lo largo de  $30 \mu\text{m}$  de la dendrita (densidad total), la prueba de Kruskal- Wallis reveló que existen diferencias significativas entre los grupos BIO, SCH, 0.0, 1.0 mA y 3.0 mA asignados para el experimento de 6 h [ $H(4) = 14.24, p = 0.0066$ ]. El análisis de comparaciones múltiples mostró que existe una mayor densidad de espinas dendríticas el grupo entrenado con 3.0 mA en comparación con los grupos control BIO y SCH ( $p$ 's  $< 0.05$ ). Las comparaciones entre el resto de los grupos no mostraron diferencias significativas ( $p$ 's  $> 0.05$ ). Para el caso del experimento de 24 h, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos [ $H(4) = 4.27, p = 0.372$ ] (Fig. 13A).

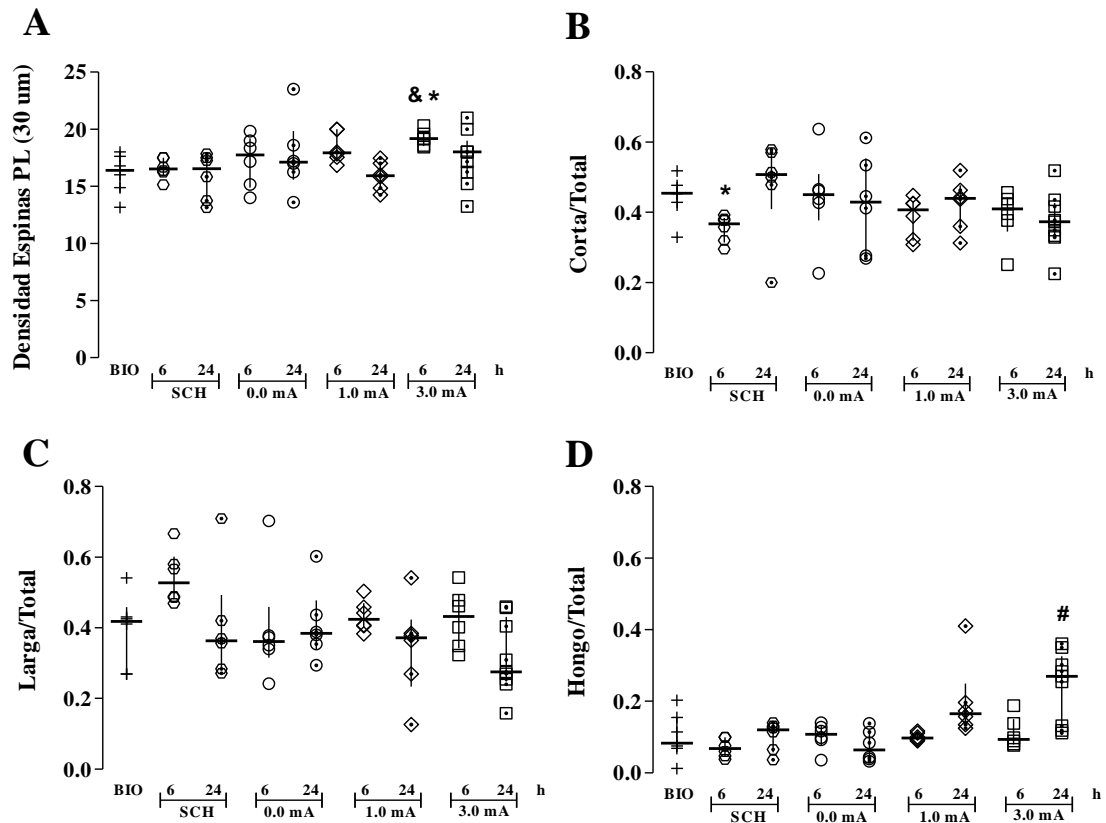


Figura 13. Resultados de la cuantificación y análisis morfológico de las espinas dendríticas en la región PL. A. Densidad total. B. Proporción de espinas tipo corta. C. Proporción de espinas tipo larga. D. Proporción de espinas tipo hongo. \*  $p < 0.05$  vs BIO. &  $p < 0.05$  vs SCH. #  $p < 0.05$  vs 0.0 mA. Todas las mediciones se muestran en medianas con rangos intercuartiles.

**Espinas tipo corta.** Se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la proporción de las espinas tipo corta en el experimento de 6 h [ $H(4) = 9.69$ ,  $p = 0.045$ ]. De acuerdo con el análisis de comparaciones múltiples, existe una menor proporción de espinas tipo corta en el grupo de SCH en comparación con el grupo que no fue asignado a ninguna prueba conductual (BIO) ( $p < 0.05$ ). No se encontraron diferencias significativas en la proporción de espinas tipo corta entre aquellos grupos asignados al experimento de 24 h [ $H(4) = 5.28$ ,  $p = 0.2592$ ] (Fig. 13B).

**Espinas tipo larga.** Se encontraron diferencias significativas en la proporción de espinas dendríticas tipo larga entre los grupos en el experimento de 6 h [ $H(4) = 9.86$ ,  $p = 0.04$ ]. El

análisis de comparaciones múltiples de Dunn mostró que existe una menor proporción de espinas dendríticas tipo larga en el grupo entrenado con 0.0 mA comparada con el grupo SCH ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones entre el resto de los grupos no mostraron diferencias significativas ( $p$ 's  $> 0.05$ ). Cuando se evaluó la proporción de espinas tipo larga entre los grupos asignados al experimento de 24 h, no se encontraron diferencias entre ellos [ $H(4) = 2.97, p = 0.561$ ] (Fig. 13C).

**Espinas tipo hongo.** No se encontraron diferencias significativas en la proporción de espinas dendríticas tipo hongo entre los grupos en el experimento de 6 h [ $H(4) = 3.85, p = 0.42$ ]. Sí se encontraron diferencias entre los grupos asignados al experimento de 24 h, cuando se evaluó la proporción de espinas tipo hongo [ $H(4) = 15.33, p = 0.0041$ ]. Se encontró que el grupo entrenado con 3.0 mA muestra un aumento significativo en este tipo de espina en comparación con los grupos control BIO y SCH ( $p < 0.05$ ). El resto de los grupos no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p$ 's  $> 0.05$ ) (Fig. 13D).

En la Figura 14 se muestra la proporción de tipo de espinas corta, larga y hongo encontradas a lo largo de 30  $\mu\text{m}$  de longitud de la dendrita en la región PL. Sólo se muestran el tipo de espinas de interés para este trabajo (Fig. 13D).

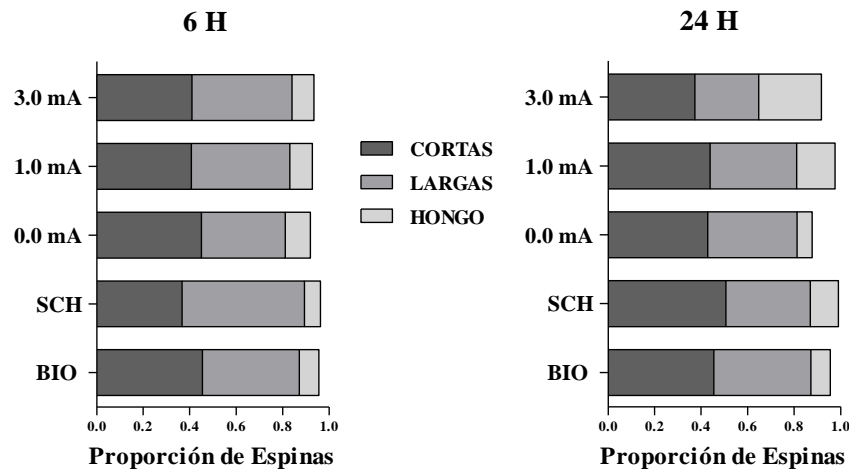


Figura 14. Representación gráfica de la proporción de espinas cortas, largas y hongo de la región PL encontradas en cada grupo de interés evaluado 6 h y 24 horas después del entrenamiento.

### 6.2.3. REGIÓN INFRALÍMBICA

**Densidad total.** La prueba de Kruskal- Wallis mostró que existen diferencias significativas entre los grupos BIO, SCH, 0.0, 1.0 mA y 3.0 mA asignados para el experimento de 6 h [ $H(4) = 17.24, p = 0.0017$ ]. El análisis de comparaciones múltiples mostró que existe una mayor densidad de espinas dendríticas el grupo entrenado con 1.0 mA en comparación con el grupo SCH ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones entre el resto de los grupos no mostraron diferencias significativas ( $p's > 0.05$ ). Para el caso del experimento de 24 h, también se encontraron diferencias significativas entre los grupos [ $H(4) = 9.77, p = 0.044$ ]. El análisis de comparaciones múltiples mostró que existe una mayor densidad de espinas dendríticas el grupo entrenado con 3.0 mA en comparación con el grupo BIO ( $p < 0.05$ ) (Fig. 15A).

**Espinas tipo corta.** Se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la proporción de las espinas tipo corta en el experimento de 6 h [ $H(4) = 11.33, p = 0.023$ ]. De acuerdo con el análisis de comparaciones múltiples, existe una mayor proporción de espinas tipo corta en el grupo de SCH en comparación con el grupo entrenado con 3.0 mA ( $p < 0.05$ ).

No se encontraron diferencias significativas en la proporción de espinas tipo corta entre aquellos grupos asignados al experimento de 24 h [ $H(5) = 1.29, p = 0.861$ ] (Fig. 15B)

**Espinas tipo larga.** Se encontraron diferencias significativas en la proporción de espinas dendríticas tipo larga entre los grupos en el experimento de 6 h [ $H(4) = 17.97, p = 0.0013$ ]. El análisis de comparaciones múltiples de Dunn mostró que existe una menor proporción de espinas dendríticas tipo larga en el grupo entrenado con 1.0 mA y en el grupo entrenado con 3.0 mA, ambos respecto al el grupo SCH ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones entre el resto de los grupos no mostraron diferencias significativas ( $p's > 0.05$ ). Cuando se evaluó la proporción de espinas tipo larga entre los grupos asignados al experimento de 24 h, también se encontraron diferencias entre ellos [ $H(4) = 13.13, p = 0.0106$ ]. Los resultados muestran una menor proporción de este tipo de espinas en el grupo entrenado con 3.0 mA comparado con el grupo BIO ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones entre el resto de los grupos no mostraron diferencias significativas ( $p's > 0.05$ ) (Fig. 15C).

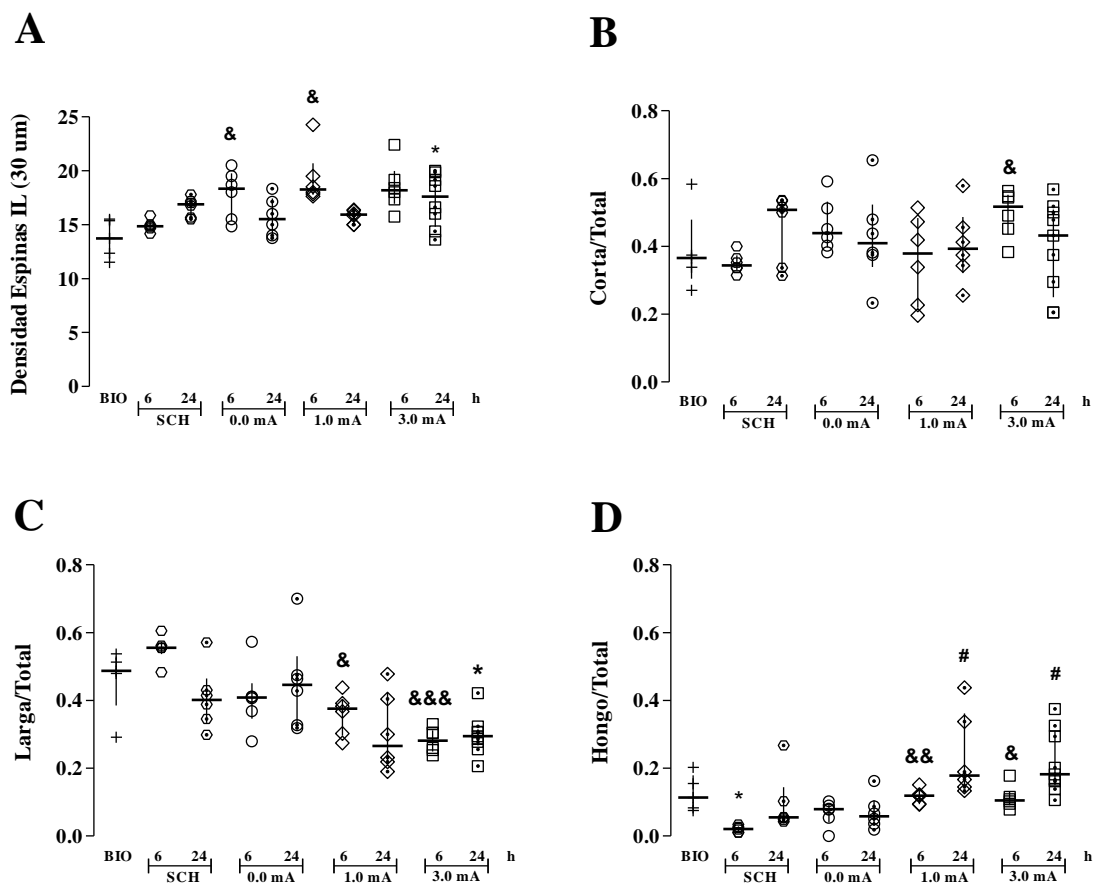


Figura 15. Resultados de la cuantificación y análisis morfológico de las espinas dendríticas en IL. A. Densidad total. B. Proporción de espinas tipo corta. C. Proporción de espinas tipo larga. D. Proporción de espinas tipo hongo. \*  $p < 0.05$  vs BIO. &  $p < 0.05$ , &&  $p < 0.01$ , &&&  $p < 0.0001$  vs SCH. #  $p < 0.05$  vs 0.0 mA. Todas las mediciones se muestran en medianas con rangos intercuartiles.

**Espinas tipo hongo.** Se encontraron diferencias significativas en la proporción de espinas dendríticas tipo hongo entre los grupos en el experimento de 6 h [ $H(4) = 17.32$ ,  $p = 0.0017$ ]. El análisis de comparaciones múltiples mostró una menor proporción de este tipo de espinas en el grupo de SCH respecto al grupo BIO ( $p < 0.05$ ) y que existe una mayor proporción de espinas dendríticas tipo hongo en el grupo entrenado con 1.0 mA ( $p < 0.05$ ) y en el grupo entrenado con 3.0 mA ( $p < 0.05$ ), ambos respecto al el grupo SCH. Las comparaciones entre el resto de los grupos no mostraron diferencias significativas ( $p$ 's  $> 0.05$ ). Cuando se evaluó la proporción de espinas tipo hongo entre los grupos asignados al experimento de 24 h se



encontraron diferencias, [H (4) = 15.19, p = 0.0045]. Se encontró que el grupo entrenado con 3.0 mA y 1.0 mA muestra un aumento significativo en este tipo de espina en comparación con el grupo de 0.0 mA (p < 0.05). El resto de los grupos no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos (p's > 0.05) (Fig. 15D).

En la Figura 16 se muestra la proporción de tipo de espinas corta, larga y hongo encontradas a lo largo de 30 µm de longitud de la dendrita en la región IL. Sólo se muestran el tipo de espinas de interés para este trabajo.

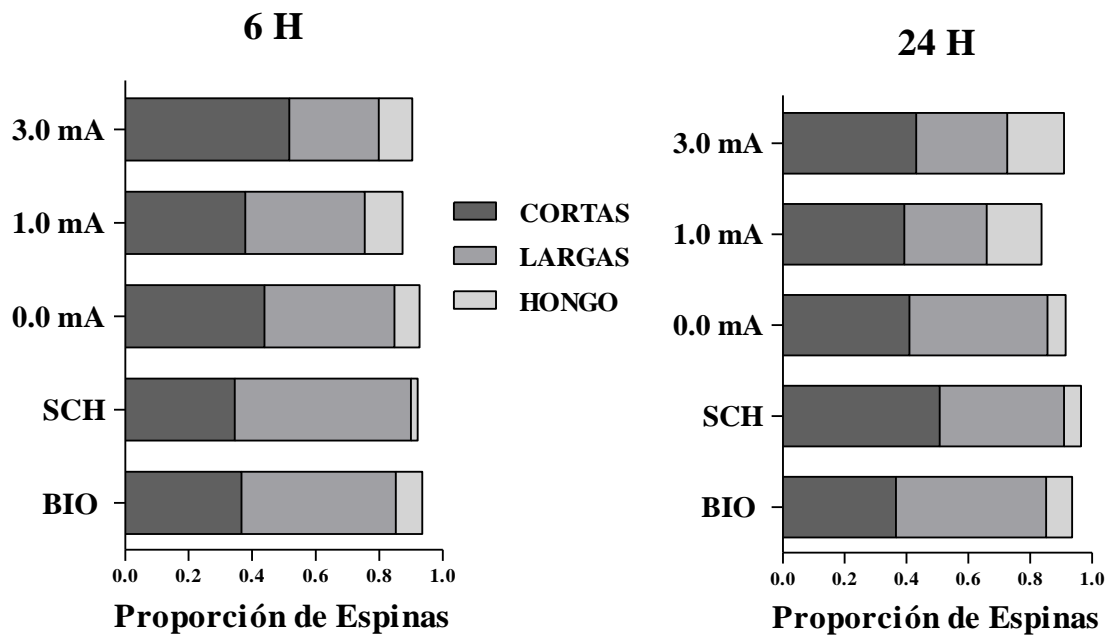


Figura 16. Representación gráfica de la proporción de espinas cortas, largas y hongo de la región IL encontradas en cada grupo de interés evaluado 6 h y 24 horas después del entrenamiento.

### 6.3. RESULTADOS DE LA INACTIVACIÓN DE LA CPFm

#### 6.3.1 ÁREA DEL CÍNGULO ANTERIOR

**Latencias de entrada y de escape.** La prueba estadística U de Mann-Whitney mostró que no hay diferencias significativas entre los grupos de TTX y VEH en las latencias de entrada

y de escape, tanto en los sujetos entrenados con 1.0 mA y 3.0 mA. Las medianas de las latencias de entrada para los grupos VEH y TTX entrenados con 1.0 mA fueron de 15.85 y 30.35 s y para aquellos entrenados con 3.0 mA fueron de 19.70 y 31.05 s, respectivamente. En cuanto a las medianas de las latencias de escape para los grupos VEH y TTX entrenados con 1.0 mA, estas fueron de 4.10 y 2.30 s y para aquellos entrenados con 3.0 mA fueron de 1.35 y 1.90 s, respectivamente. En la siguiente tabla se muestran los valores estadísticos:

<b>VEH vs TTX</b>			
<b>Latencia de entrada</b>		<b>Latencia de escape</b>	
<b>1.0 mA</b>	<b>3.0 mA</b>	<b>1.0 mA</b>	<b>3.0 mA</b>
<b>U= 7.0</b>	<b>U=16.0</b>	<b>U=12.0</b>	<b>U=13.0</b>
<b>p = 0.15</b>	<b>p = 1.0</b>	<b>p = 0.57</b>	<b>p = 0.68</b>
<b>n=4, 8</b>	<b>n=8, 4</b>		

**Latencias de Retención.** Como puede observarse en la figura 17, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo VEH y TTX en las latencias de retención medidas 48 h después del entrenamiento, sin importar si la intensidad del choque eléctrico fuera de 1.0 mA ( $p = 0.46$ ) o 3.0 mA ( $p = 0.81$ ) (Fig. 17A).

**Inmunohistoquímica para c-Fos.** La administración de TTX en el ACa provocó una reducción significativa de la expresión de c-Fos en relación con la expresión observada en el grupo tratado con VEH, esto se observó tanto en los grupos entrenados con 1.0 mA, como en aquellos entrenados con 3.0 mA ( $p=0.31$  para ambas intensidades) (Fig. 17B).

**Análisis histológico.** La figura 17C muestra la localización de la cánula y la punta del inyector en la región del ACa.

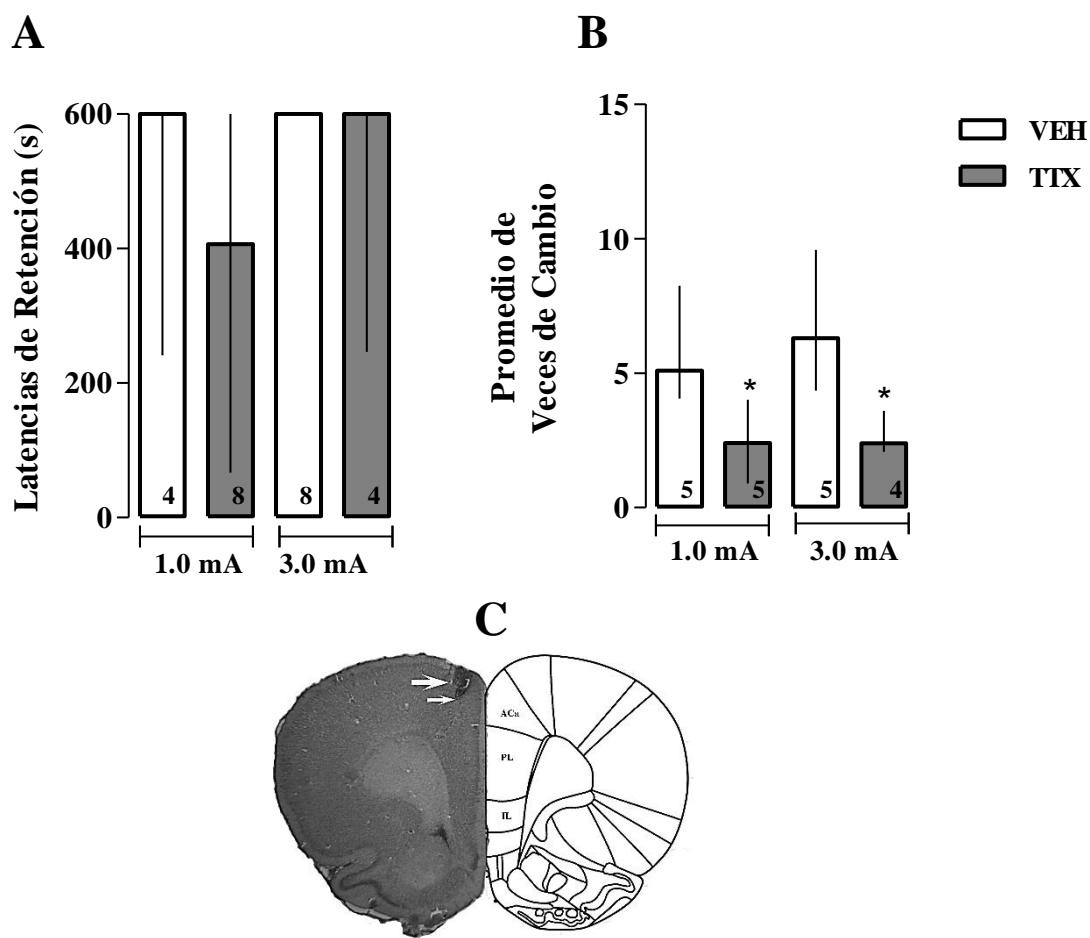


Figura 17. La inactivación del ACa no provoca deterioro en la MLP de la tarea de E.I. **A.** Están graficadas las medianas con sus rangos intercuartiles de las latencias de retención de los grupos a los que se administró solución vehículo (VEH) o TTX (10 ng) 25 min antes del entrenamiento en el área del cíngulo anterior (ACa), y que se entrenaron con una intensidad de choque eléctrico de 1.0 mA o 3.0 mA. **B.** La TTX produjo una disminución de la expresión de la proteína c-Fos alrededor de la zona de inyección. \*  $p < 0.05$  vs VEH. **C.** Fotografía representativa donde se muestra la localización de la cánula (flecha superior) y la punta del inyector (flecha inferior). Los números bajo las barras indican el tamaño de la muestra.

### 6.3.2. REGIÓN PRELÍMBICA

**Latencias de entrada y de escape.** No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de TTX y VEH en las latencias de entrada y de escape, en los sujetos entrenados con 1.0 mA y 3.0 mA. Las medianas de las latencias de entrada para los grupos VEH y TTX entrenados con 1.0 mA fueron de 26.20 y 40.20 s y para aquellos entrenados con 3.0 mA fueron de 26.40 y 28.80 s, respectivamente. En cuanto a las medianas de las latencias de

salida para los grupos VEH y TTX entrenados con 1.0 mA, estas fueron de 1.40 y 1.80 s y para aquellos entrenados con 3.0 mA fueron de 0.60 y 0.80 s, respectivamente. En la siguiente tabla se muestran los valores estadísticos:

VEH vs TTX			
Latencia de entrada		Latencia de escape	
1.0 mA	3.0 mA	1.0 mA	3.0 mA
U= 18.5	U=31.0	U= 24.5	U=49.0
p= 0.18	p= 1.0	p= 0.48	p= 49.0
n=7,9	n=9,7		

**Memoria de largo plazo.** Como puede observarse en la figura 18A, la administración de TTX en la región PL de la CPFm provoca una disminución en la latencia de retención únicamente en aquellos sujetos entrenados con 1.0 mA, en comparación con el grupo tratado con VEH ( $p = 0.02$ ). Por el lado contrario, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo VEH y TTX en las latencias de retención medidas 48 h después del entrenamiento 3.0 mA ( $p = 0.13$ ).

**Prueba de adquisición.** Con el fin de determinar que el déficit en la MLP en los sujetos entrenados con 1.0 mA no es debido a una interferencia con el proceso de adquisición de la tarea, los sujetos fueron evaluados dos veces, 30 min y 48 h después del entrenamiento. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo VEH y TTX en las latencias de retención medidas 30 min ( $p=0.95$ ) y 48 h después del entrenamiento sí se observa una disminución ( $p = 0.03$ ) (Fig. 18B).

**Dependencia de estado.** Debido a que, en nuestros experimentos previos, la droga se administró antes del entrenamiento, evaluamos el posible efecto de dependencia de estado de la TTX. Para ello, administramos la TTX o VEH 25 minutos antes del entrenamiento y antes de la prueba. Un déficit significativo en la latencia de retención se produjo por la infusión de TTX en la región PL en el grupo entrenado con 1.0 mA ( $p<0.05$ ). Por lo tanto, no se presentó la dependencia de estado (Fig. 18C).

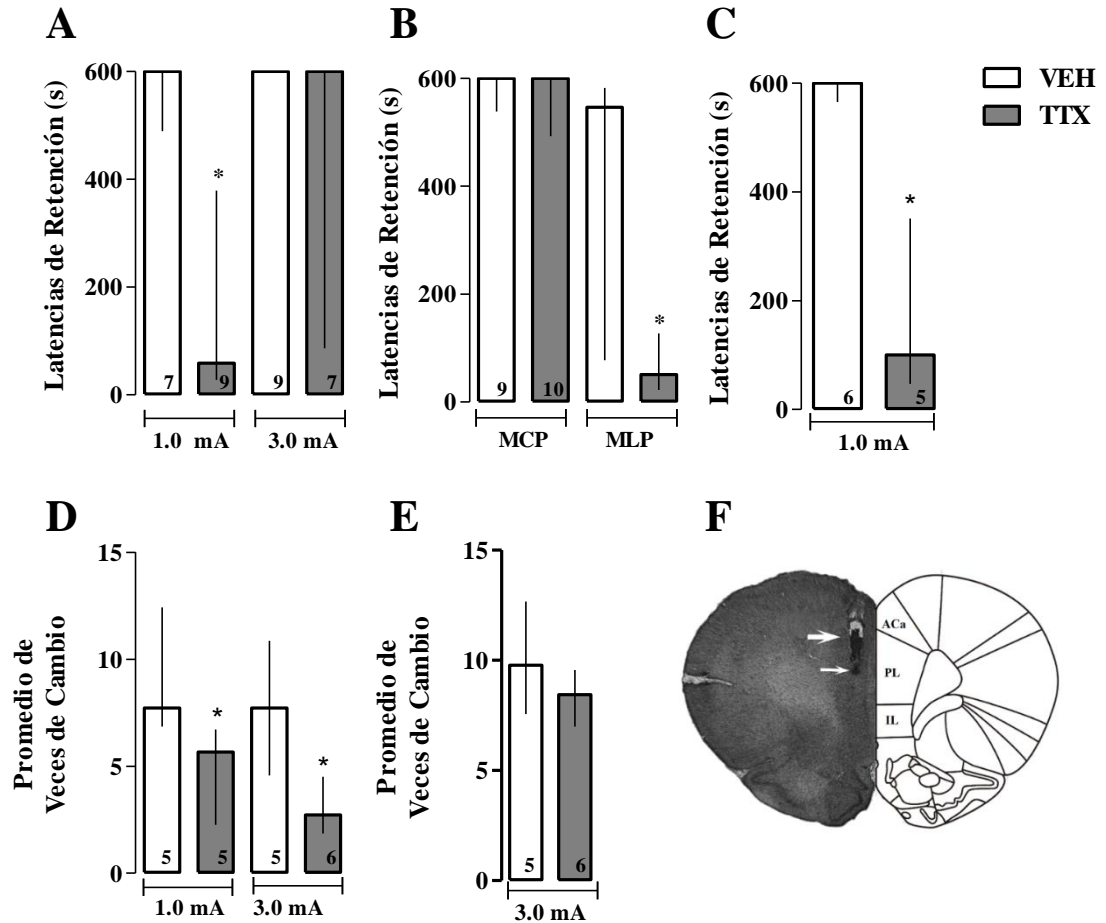


Figura 18. Efecto protector del entrenamiento intenso ante la inactivación de la región PL. Están graficadas las medianas con sus rangos intercuartiles de las latencias de retención de los grupos a los que se administró vehículo o TTX (10 ng) pre-entrenamiento en la región PL, y que se les administró un choque eléctrico de 1.0 mA o 3.0 mA. **A.** Evaluación de la memoria de largo plazo, la TTX administrada en la región IL, provoca un deterioro en la memoria en los grupos entrenados con 1.0 mA. **B.** Evaluación de la MCP; indicando que no hay alteración en la adquisición de la tarea. **C.** Dependencia de estado, la administración de TTX no provoca este fenómeno. **D.** La TTX produjo una disminución de la expresión de la proteína c-Fos alrededor de la zona de inyección. \*  $p < 0.05$  vs VEH **E.** La TTX no produjo una disminución de la expresión de la proteína c-Fos 600  $\mu\text{m}$  alrededor de la zona de inyección. **F.** Fotografía representativa donde se muestra la localización de la cánula (flecha superior) y la punta del inyector (flecha inferior). Los números bajo las barras indican el tamaño de la muestra.

**Inmunohistoquímica para c-Fos.** La administración de TTX en la región PL provocó una reducción significativa de la expresión de c-Fos en relación con la expresión observada en el

grupo tratado con VEH, esto se observó tanto en los grupos entrenados con 1.0 mA, como en aquellos entrenados con 3.0 mA ( $p = 0.03$  y  $p = 0.02$ , respectivamente) (Fig. 18D).

La expresión de c-Fos también se cuantificó 600  $\mu\text{m}$  por debajo de la punta del inyector colocado en la región PL, no se encontraron diferencias entre los grupos VEH y TTX ( $p = 0.73$ ) esto demuestra que los déficits observados en la memoria no son debido a la infusión de la TTX a regiones más ventrales, en este caso a la región IL (Fig. 18E).

**Análisis histológico.** La figura 18F muestra la localización de la cánula y la punta del inyector en la región PL.

### 6.3.4. REGIÓN INFRALÍMBICA

**Latencias de entrada y de escape.** No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de TTX y VEH en las latencias de entrada y de escape, tanto en los sujetos entrenados con 1.0 mA y 3.0 mA. Las medianas de las latencias de entrada para los grupos VEH y TTX entrenados con 1.0 mA fueron de 25.60 y 33.60 s y para aquellos entrenados con 3.0 mA fueron de 23.50 y 24.20 s, respectivamente. En cuanto a las medianas de las latencias de salida para los grupos VEH y TTX entrenados con 1.0 mA, estas fueron de 1.20 y 1.70 s y para aquellos entrenados con 3.0 mA fueron de 2.70 y 2.30 s, respectivamente. En la siguiente tabla se muestran los valores estadísticos:

VEH vs TTX			
Latencia de entrada		Latencia de escape	
1.0 mA	3.0 mA	1.0 mA	3.0 mA
U=22.0	U=49.0,	U=18.5	U=43.50
p= 0.797	p= 0.9705	p=0.476	p= 0.649
n=7,7	n=10,10		

**Memoria de largo plazo.** Como puede observarse en la figura 18, la administración de TTX en la región IL de la CPFm provocó una disminución en la latencia de retención no solo en aquellos sujetos entrenados con 1.0 mA ( $p = 0.01$  vs VEH), sino que, de manera inesperada, también en aquellos entrenados con una intensidad incrementada de 3.0 mA ( $p = 0.005$  vs VEH) (Fig. 19A).

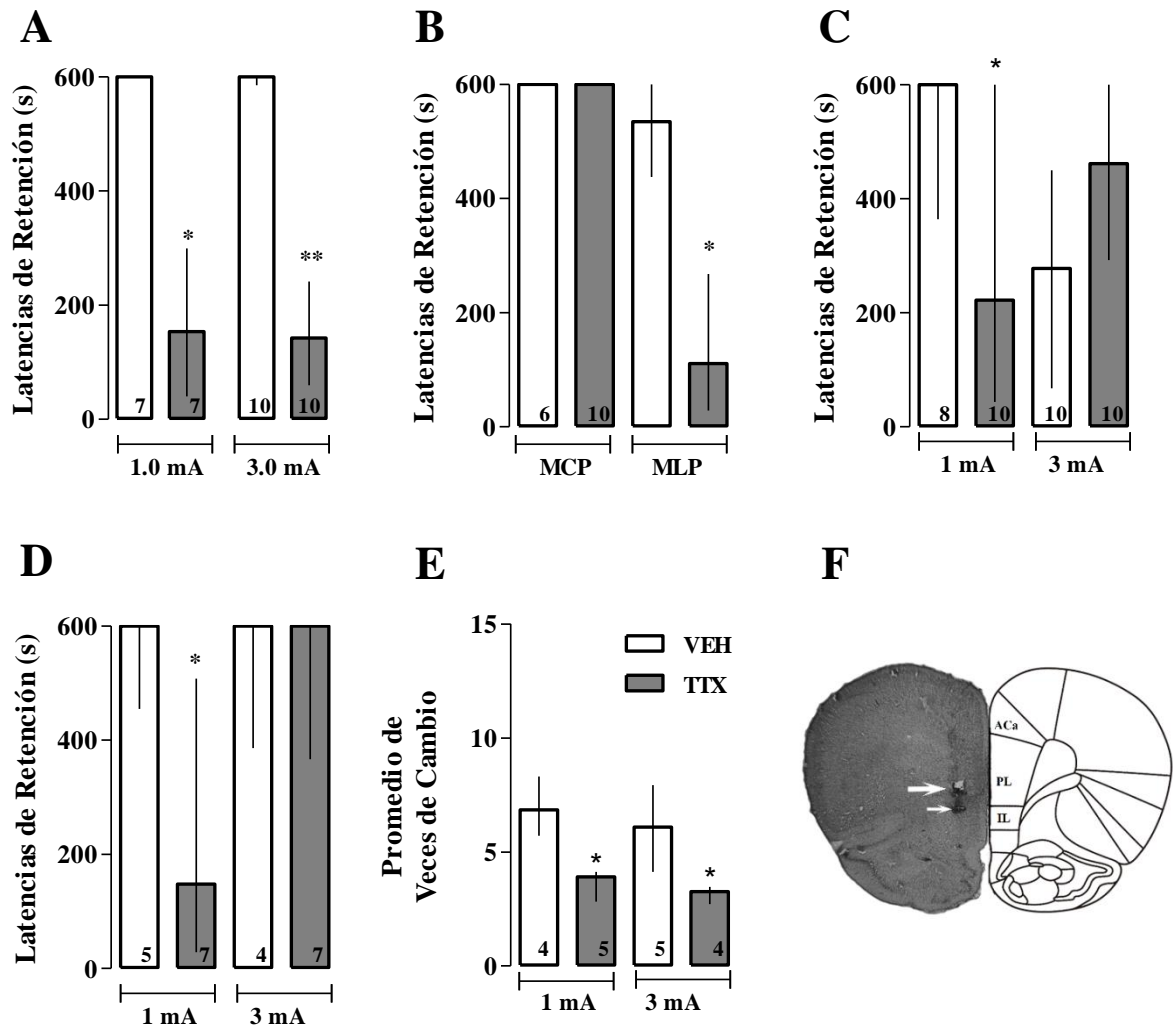


Figura 19. Efecto protector del entrenamiento intenso ante la inactivación de la región IL y un caso de dependencia de estado. Están graficadas las medianas con sus rangos intercuartiles de las latencias de retención de los grupos a los que se administró vehículo o TTX (10 ng) pre-entrenamiento en la región IL, y que se les administró un choque eléctrico de 1.0 mA o 3.0 mA. A. Evaluación de la memoria de largo plazo, la TTX administrada en la región IL, provoca un deterioro en la memoria en los grupos entrenados con ambas intensidades. B. Evaluación de la MCP; indicando que no hay alteración en la adquisición de la tarea. C. Dependencia de estado, la administración de TTX provocó este fenómeno en los sujetos entrenados con 3.0 mA. D. Efecto protector, la administración de TTX inmediatamente después del entrenamiento en la región IL, provoca un deterioro en la memoria en los grupos entrenados con 1.0 mA E. La TTX produjo una disminución de la expresión de la proteína c-Fos alrededor de la zona de inyección. \*  $p < 0.05$  vs VEH. F. Fotografía representativa donde se muestra la localización de la cánula (flecha superior) y la punta del inyector (flecha inferior). Los números bajo las barras indican el tamaño de la muestra.

**Prueba de adquisición.** Con el fin de determinar que el déficit en la MLP en los sujetos entrenados con 3.0 mA no es debido a una interferencia con el proceso de adquisición de la tarea, los sujetos fueron evaluados dos veces, 30 min y 48 h después del entrenamiento. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo VEH y TTX en las latencias de retención medidas 30 min ( $p=0.85$ ) y 48 h después del entrenamiento sí se observa una disminución ( $p = 0.02$ ) (Fig 19B).

**Dependencia de estado.** Debido a que, en nuestros experimentos previos, la droga se administró antes del entrenamiento, evaluamos el posible efecto de dependencia de estado de la TTX. Para ello, administramos la TTX o VEH 25 minutos antes del entrenamiento y antes de la prueba. Un déficit significativo en la latencia de retención se produjo por la infusión de TTX en la región IL en los grupos entrenados con 1.0 mA ( $p<0.05$ ), es decir, no hubo dependencia de estado. Sin embargo, en el grupo entrenado con 3.0 mA no existen diferencias significativas entre los grupos VEH y TTX ( $p=0.11$ ), lo que indica que en estas condiciones si se presentó una dependencia de estado (Fig. 19C).

**Análisis histológico.** La figura 19F muestra la localización de la cánula y la punta del inyector en la región IL (Fig. 19E).

### **Efecto de la administración de TTX después del entrenamiento en IL**

**Memoria de largo plazo.** Para esclarecer el papel que tiene la región IL en la memoria de la tarea de EI, ya que el resultado previo mostró que existe un efecto dependiente de estado. Se entrenaron dos grupos de ratas con una intensidad de choque de 1.0 mA y otro con una intensidad de 3.0 mA. Posteriormente, la mitad de cada grupo se inyectó con VEH o TTX. Como se observa en la figura 19D, encontramos un déficit en la retención de la memoria de largo plazo únicamente en aquellos sujetos entrenados con la intensidad de 1.0 mA ( $p<0.03$  vs VEH), en aquellos entrenados con la intensidad de 3.0 mA no se encontraron diferencias significativas entre los grupos VEH y TTX ( $p=0.11$ ) (Fig. 19D).

**Inmunohistoquímica para c-Fos.** La administración de TTX en la región IL provocó una reducción significativa de la expresión de c-Fos en relación con la expresión observada en el



grupo tratado con VEH (Figura 19E), esto se observó tanto en los grupos entrenados con 1.0 mA, como en aquellos entrenados con 3.0 mA ( $p = 0.03$  y  $p = 0.02$ , respectivamente).

**Cuantificación de corticosterona.** La prueba de Kruskal- Wallis reveló que existen diferencias significativas entre los grupos al evaluar el efecto de la intensidad del entrenamiento en los grupos tratados con VEH [ $H(4) = 12.47$ ,  $p = 0.0059$ ]. De acuerdo con el análisis de comparaciones múltiples, existe una mayor liberación de CORT en los sujetos entrenados con 3.0 mA o que recibieron SCH, respecto al grupo que solo fue manipulado (B) ( $p < 0.01$ ). Para el caso de los grupos tratados con TTX, también hubo diferencias significativas entre los grupos [ $H(3) = 12.54$ ,  $p = 0.0019$ ], y el incremento en la liberación de CORT se observó ante ambas intensidades de entrenamiento, 1.0 mA ( $p < 0.01$ ) y 3.0 mA ( $p < 0.001$ ), respecto al grupo B. Como puede observarse en la siguiente figura.

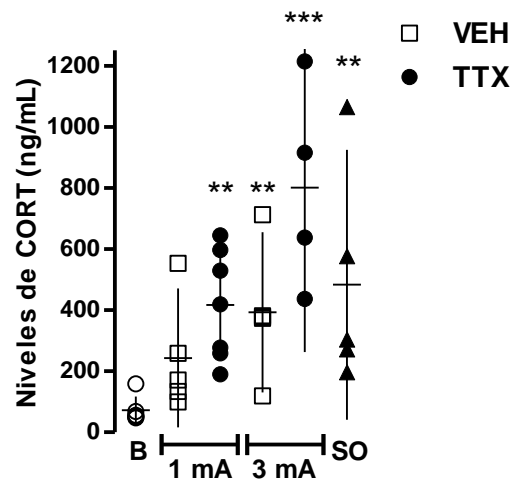


Figura 20. La concentración de CORT en suero de acuerdo con la intensidad e inactivación de región IL.  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.0001$  vs B. Todas las mediciones se muestran en medianas con rangos intercuantiles.

---

## 7. DISCUSIÓN

---

Los primeros resultados conductuales obtenidos de la prueba de extinción, nos indicaron que el grupo entrenado con una intensidad de choque eléctrico de 3.0 mA presentan alta resistencia a la extinción, en comparación con aquel grupo entrenado con 1.0 mA, tal como ya ha sido reportado previamente en el laboratorio (Bello-medina, Flores, Quirarte, Mcgaugh, y Prado-Alcalá, 2016; Garín-Aguilar et al., 2012; Prado-Alcalá, Haiek, Rivas, Roldan-Roldan, y Quirarte, 1994). Esto nos permitió confirmar que, para nuestro estudio, la intensidad de 3.0 mA corresponde al entrenamiento intenso y la intensidad de 1.0 mA al entrenamiento moderado.

Por otra parte, los resultados de cuantificación de la densidad y tipo de espinas detríticas en cada una de las regiones de la CPFm encontramos que, en el ACa, el entrenamiento en EI no produce modificaciones en la densidad total de espinas detríticas ya sea a las 6 h o 24 h, o ante cualquier modalidad de entrenamiento. Sin embargo, el entrenamiento si produce una disminución de las espinas tipo larga en aquellos sujetos entrenados con la intensidad alta, además se observó un incremento en las espinas tipo hongo ante la misma intensidad y a las 24 h. Contrario a la ocurrido en el ACa, en la región PL, si encontramos un incremento en la densidad de espinas dendríticas después del entrenamiento intenso, pero solo en el grupo evaluado 6 h después. Además, hubo un decremento de espinas tipo corta 6 h después en el grupo que recibió solo el estímulo aversivo (grupo control de sólo choque, SCH), y un incremento en las espinas tipo hongo en los sujetos que recibieron entrenamiento intenso y evaluados 24 h después. Para el caso de la región IL, los resultados más importantes indican que la exposición al contexto y el entrenamiento moderado podría provocar un aumento en la densidad de espinas dendríticas únicamente 6 h después del entrenamiento y no 24 h después, y que el entrenamiento intenso induce un aumento en la proporción de espinas 24 h después. Seis horas después del entrenamiento, se observó un aumento en espinas tipo corta y tipo hongo y una disminución de las espinas tipo larga en aquellos sujetos entrenados con 3.0 mA, mientras que 24 h después este mismo

entrenamiento la disminución de las espinas tipo larga y un incremento en las espinas tipo hongo.

Como se puede notar, en cada una de las regiones de la CPFm se observaron ciertas modificaciones a nivel de las espinas dendríticas, algunas de ellas atribuibles al choque eléctrico o al contexto (grupo de 0.0 mA). Debido a esta heterogeneidad en los datos, y para determinar el papel que podría tener cada región de la CPFm en la consolidación de la memoria, procedimos a realizar la inactivación con TTX, de manera independiente en cada región de la CPFm, encontramos que independientemente de la intensidad del estímulo la inactivación temporal de la región del ACa no interfiere con la consolidación de la memoria de la tarea de EI, mientras que, cuando la TTX se administró en la región PL e IL, se observó un déficit en la consolidación de la memoria cuando el entrenamiento fue moderado (1.0 mA). Un hallazgo peculiar fue la dependencia de estado que se encontró al administrar la TTX en la región infralímbica en los sujetos entrenados con 3.0 mA. Debido a esto, se realizó la administración de TTX inmediatamente después del entrenamiento, encontrando que solo se interfiere con la memoria en aquellos sujetos entrenados con intensidad moderada. Los diferentes efectos que se observaron podrían explicarse con las diferencias anatómicas en las diferentes regiones. Como ya se describió previamente, las tres regiones reciben información del mismo núcleo talámico (dorsomedial), además, las regiones PL e IL reciben aferencias del núcleo basolateral y baso medial de la amígdala. También se ha reportado que la región PL recibe más información de regiones límbicas que el ACa y la región IL.

Los resultados inmunohistoquímicos demostraron que la administración de TTX en cada una de estas regiones corticales produjo una disminución en la actividad celular, esto fue comprobado al observar una disminución en la expresión de la proteína c-Fos cerca del área de inyección. Por lo tanto, es posible asociar los resultados conductuales con la disminución en la actividad cerebral de cada región. Además, con los resultados obtenidos de las latencias de entrada y de escape, podemos decir que esta inactivación no provoca alteraciones motoras o perceptuales que puedan comprometer el correcto desempeño de la tarea de EI ya que no se encontraron diferencias entre los grupos control y de TTX para cada experimento, todos los animales fueron capaces de cruzar del compartimento de seguridad,

al compartimento de castigo y todos los sujetos fueron capaces de escapar del choque de manera eficiente.

Es importante considerar que la participación de la CPFm en su gradiente dorsoventral en la memoria de la tarea de EI ha sido poco estudiada, la mayoría de los estudios han sido realizados en tareas de condicionamiento de miedo al contexto o al tono. La contribución de cada región podría ser totalmente diferente debido a que el repertorio conductual requerido para cada tipo de tarea es totalmente distinto, pues, mientras que en el condicionamiento clásico se requiere de conductas ‘pasivas’ y automáticas, en la tarea de EI se requiere de una conducta ‘activa’, ya que el sujeto debe tomar la decisión de cruzar o no al compartimento de castigo basándose en la experiencia previa, además, esta tarea se adquiere en un solo ensayo, con un estímulo aversivo de mayor intensidad.

A continuación, se expone una discusión particular para cada una de las regiones.

### **7.1. ÁREA DEL CÍNGULO ANTERIOR**

De acuerdo con los antecedentes, el ACa podría modular e integrar el componente emotivo y cognitivo del estímulo aversivo, procesos necesarios para la correcta asociación entre estímulos durante la adquisición de la tarea de EI y además de participar en el proceso de adquisición, existen reportes de que esta región podría estar asociada a la fase de consolidación pues la interferencia con la proteína Arc provoca un deterioro en la memoria de esta tarea (Holloway y McIntyre 2011). La expresión de esta proteína está íntimamente asociada a la estructura de las espinas dendríticas, así como a las modificaciones sinápticas que ocurren en la zona donde se expresa. Por lo que en nuestros experimentos esperábamos observar modificaciones en las espinas de las dendritas basales de las neuronas piramidales asociadas al entrenamiento independientemente de la intensidad. Los datos no mostraron diferencias significativas en la densidad de espinas dendríticas en ninguno de los grupos, estos resultados coinciden con algunos estudios donde emplean tareas con un componente aversivo, como es el caso del condicionamiento de miedo al contexto, donde al evaluar 24 h después del entrenamiento no encuentran modificaciones ni en densidad de las espinas, pero sí se observan cuando se cuantifican días posteriores al entrenamiento (Wartman y Holahan,

2014), sugiriendo que el ACa está asociada al almacén de memorias remotas (consolidación de sistemas) (Restivo et al., 2009; Vetere et al., 2011). A pesar de no encontrar modificaciones en la densidad, sí encontramos cambios en la morfología de las espinas dendríticas 24 h después del entrenamiento en los sujetos entrenados con la intensidad de choque eléctrico de 3.0 mA, observándose una disminución en las espinas tipo larga y un incremento en las espinas tipo hongo. A las 6 h se puede ver un decremento en las espinas tipo larga ante la misma intensidad, pero solo es significativamente diferente del grupo SCH. Es importante destacar que estos cambios morfológicos no se deben a la exposición al contexto o al estímulo aversivo por sí solos. Estos datos podrían indicar que las modificaciones asociadas a la memoria del evento ocurren 6 h después del entrenamiento y únicamente ante intensidades altas del estímulo aversivo, pues ante un estímulo aversivo de menor intensidad parecen ocurrir pequeñas modificaciones dentro de las 6 primeras horas, pero no persisten horas después. El estudio de la dinámica morfológica de las espinas en respuesta a la experiencia ha llevado a plantear que existe una correlación negativa entre la presencia de espinas tipo larga y las espinas tipo hongo, tal como puede observarse en nuestros datos. Se considera que esta correlación se debe a que las espinas tipo larga son más susceptibles a modificar su forma y estructura y por ello se relacionan con la fase aprendizaje, si el estímulo en la postsinápsis es lo suficientemente fuerte, se desencadenan cascadas de señalización que llevan al reclutamiento de proteínas que modifican la estructura de la espina hasta transformarla en una espina de tipo hongo, la cuál es más estable, por lo tanto está más asociada a consolidación y a una memoria más sólida, de largo plazo (Bourne y Harris, 2007; Medvedev et al., 2014; Rochefort y Konnerth, 2012).

Por otra parte, la inactivación en el ACa no interfirió con la consolidación de la memoria, esto coincide con el reporte de Mello e Souza y colaboradores (1999), en el que demostraron que la administración de muscimol (agonista de los receptores GABA) o AP5 (un antagonista de los receptores a NMDA) no interfiere con la consolidación de la memoria de esta tarea. Incluso, lesiones por radiofrecuencia antes del entrenamiento en esta región tampoco muestran alteraciones en la consolidación de la memoria (Chai et al., 2010).

Tomando en cuenta esto, nuestros resultados sugieren que la región del ACa podría no estar involucrada en la codificación y actividad neuronal necesaria para la consolidación de la memoria de la asociación del estímulo condicionado e incondicionado durante el entrenamiento de la tarea de EI. Sin embargo, esta interpretación debe tomarse con precaución ya que otras líneas de investigación, incluso los resultados de la morfología de espinas dendríticas, sugieren que esta región sí está involucrada en la consolidación de la tarea de EI, ya que se ha encontrado que la infusión de un agonista colinérgico (oxotremorina) en el ACa inmediatamente después del entrenamiento de EI mejora la memoria (Malin y McGaugh, 2006), mientras que la administración de un antagonista colinérgico administrado antes y después del entrenamiento interfiere con la consolidación de esta tarea (Riekkinen et al., 1995). No obstante, las condiciones de entrenamiento en ambos estudios difiere de las nuestras, pues en el primer estudio mencionado el entrenamiento se realizó en dos ensayos y en el segundo estudio, el entrenamiento se realizó después de haber ejecutado una tarea espacial en el laberinto acuático de Morris. Además, la administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas en el ACa o en la CPFm en ratones (incluyen a la región PL e IL) produce un déficit en la retención de la tarea de EI (Zhang et al. 2011). Estos resultados también se observan después de la disminución de la expresión de la proteína Arc en esta región inmediatamente después o 6 h después del entrenamiento (Holloway y McIntyre 2011).

El hecho de que la inhibición de Arc 6 h después del entrenamiento provoque amnesia propone la existencia de una segunda oleada de transcripción y traducción que podría ser requerida para la consolidación, tal como ha sido demostrado en hipocampo (Ramirez-Amaya, 2005), nuestros resultados de la morfología de las espinas dendríticas muestran que la mayor proporción de espinas tipo hongo se encuentran 24 h después del entrenamiento y no 6 h después, estas modificaciones probablemente estén asociados a este fenómeno, al menos para la condición de entrenamiento intenso. Aunado a esto, se propone que el proceso de consolidación es un evento que podría requerir de dos fases, una temprana que involucra la activación de receptores a glutamato y una fase tardía, que, además de requerir la activación de estos, también requiere de la activación de receptores activados por neuromoduladores, como la dopamina, noradrenalina y los glucocorticoides (Bernabeu et al.,

esta activación llevará a la activación de factores de transcripción como CREB, los cuales regulan a los genes de expresión temprana necesarios para las modificaciones postsinápticas. Se sabe que en la tarea de EI, debido al componente aversivo, existe liberación de los neuromoduladores antes mencionados, y que al menos para el caso de los glucocorticoides están en relación con la intensidad del choque eléctrico (González- Franco et al., 2017). Para el caso de los resultados obtenidos de la inactivación, podría ser que no encontramos déficits en la memoria debido a que la administración de la TTX se realizó 30 min antes del entrenamiento, el efecto máximo de inactivación ocurre entre los 30 y 120 min después de la administración y decrece exponencialmente, de tal forma que su actividad decrece al 50% y 25% a los 210 min y 290 min, respectivamente (Lorenzini et al., 1999; Boehnke y Rasmusson, 2001; Lorenzini et al., 1996; Zhuravin y Bures, 1991), por lo tanto, esta segunda oleada pudo estar intacta, llevando a la consolidación de la memoria.

## **7.2. REGIÓN PRELÍMBICA**

Las neuronas piramidales de la corteza prefrontal presentan una gran capacidad de plasticidad estructural en respuesta a experiencias aversivas y estresantes, ya sean agudas o crónicas (Radley et al. 2007; Wellman, 2001). Existen reportes que demuestran que la región PL podría ser más sensible al estrés que la región IL, pues hay una disminución de las espinas dendríticas, en las espinas tipo corta o en la proporción de espinas tipo hongo/larga, especialmente cuando se trata de un estrés crónico (Moench y Wellman, 2017). Además, al igual que el ACa y de acuerdo con Zhang y colaboradores (2011), la región PL podría requerir de la expresión de genes asociados a plasticidad sináptica para la consolidación de la memoria de la tarea de EI, pues la administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas deteriora la MLP de la tarea. Sin embargo, nuestros resultados no fueron tan claros como los reportados en la literatura, por ejemplo, el incremento en la densidad de espinas dendríticas observado en el grupo de 3.0 mA- 6 h, podría indicarnos que la región PL podría estar asociada con la consolidación de la tarea en condiciones de intensidad alta, además, podría existir un proceso de estabilización de las sinapsis en aquellos sujetos entrenados con intensidad alta, pues se puede observar un incremento en el número de espinas tipo hongo 24 h después del entrenamiento. Las modificaciones en la morfología de las espinas podrían no estar asociadas con el contexto, pero quizás esta región llega a ser sensible al componente aversivo, ya que se presentó una disminución de las espinas tipo corta (inmaduras) en el grupo de SCH-6 h.

La falta de resultados claros en la cuantificación de espinas dendríticas en esta región, a diferencia de otras investigaciones, podría ser que el paradigma empleado en nuestra investigación se presenta en un solo y único ensayo. También tenemos que considerar que la CPFm es considerada un área de asociación multimodal, una región compleja que recibe información de múltiples áreas, la cual está organizada en diferentes capas y que presenta un gradiente rostral-dorsal. Por lo que, la técnica empleada podría ser poco sensible para permitir detectar los posibles cambios asociados al procesamiento de la información requerida para el aprendizaje y/o memoria de la tarea de EI.

Aunado a esto, Song y Moyer (2018) demostraron las diferencias en cuanto a las capacidades eléctricas de las neuronas piramidales de la mPFC, indicando que son heterogéneas tanto entre capas como en una subregión específica. Particularmente, las neuronas de la capa V se muestran más despolarizadas y más excitables que las neuronas de la capa II-III. Además, las neuronas infralímbica son más excitables que las neuronas prelímbicas en la capa más superficial y es la capa V de la región PL, la que recibe principalmente aferencias del hipocampo dorsal, estructura asociada con la consolidación de memorias contextuales y a la tarea de EI, por lo tanto, sería necesario evaluar los cambios en la morfología de las espinas dendríticas en las neuronas de la capa V.

Los resultados encontrados ante la inactivación de la región PL muestran un déficit en la retención de la tarea de EI cuando la intensidad del choque eléctrico es moderada y no altera la memoria en aquellos sujetos entrenados con intensidad alta, este último hecho resulta consistente con los resultados previos del laboratorio, donde una interferencia con estriado (Giordano y Prado-Alcalá, 1986; Pérez-Ruiz y Prado-Alcalá, 1989), hipocampo (Garín-Aguilar et al., 2014; Quiroz et al., 2003), amígdala (Parent et al., 1994; Parent et al., 1992) y sustancia nigra (Cobos-Zapiaín et al., 1996) alteran la memoria con intensidades moderadas de choque eléctrico, pero no con intensidades más altas. No obstante, existe un reporte que indica que esta región es requerida para la consolidación de esta tarea, independientemente de la intensidad. Cabe señalar que esta observación fue realizada en ratones y en la versión de plataforma del paradigma de EI (Canto-de-Souza y Mattioli, 2016).



Asimismo, la deficiencia observada en los sujetos entrenados con la intensidad baja no es debida a alteraciones en el aprendizaje, tal como fue comprobado al evaluar la memoria de corto plazo (30 minutos después del entrenamiento), mostrando el déficit en la memoria únicamente cuando se evaluó por segunda ocasión 48 h después del entrenamiento.

Debido a que el entrenamiento tomo lugar bajo la influencia de la TTX, y la retención se evaluó sin la presencia del fármaco. Es posible que bajo estas condiciones estemos ante un fenómeno de dependencia de estado y no a un efecto amnésico causado por la interferencia en la consolidación de la memoria. Este posible efecto fue descartado ya que el grupo de ratas que fue entrenado y evaluado bajo las mismas condiciones farmacológicas presentó el déficit en la memoria.

Estos resultados apoyan aquellos encontrados por Santos-Anderson y Routtenberg (1976) y por Jinks y McGregor (1997). Los primeros autores encontraron que la estimulación eléctrica en la región ventral de la CPFm interfiere con la consolidación de la memoria, mientras que los segundos encontraron que la lesión electrolítica de la región PL produce déficits en EI. Estos resultados indican que esta región podría tener funciones similares a las del estriado, hipocampo, amígdala y sustancia nigra en la consolidación de la memoria de la tarea de EI. Incluso, el efecto de su inactivación sobre la memoria de un entrenamiento aversivo intenso es el similar al reportado en nuestro laboratorio (Prado-Alacalá y Quirarte, 2007).

Se ha hipotetizado que esta y otras regiones no son críticas para que se lleve cabo la asociación a largo plazo, al menos con las condiciones experimentales realizadas hasta ahora en entrenamiento intenso en la tarea de EI, pues podría requerirse de una red diferente o más amplia que permita los cambios plásticos necesarios que aseguren el almacén de la memoria de un evento altamente aversivo. Esto proveería de ventajas para la seguridad del organismo.

### **7.3. REGIÓN INFRALÍMBICA**

La región IL se ha relacionado con el control inhibitorio en distintos paradigmas conductuales, por ello, ha llamado la atención el papel que esta región podría tener en la extinción de la memoria, sin embargo, pocos estudios la han relacionado con la consolidación de la memoria de largo plazo. Nuestros resultados de la cuantificación de espinas dendríticas en esta región parecen indicar que dentro de las primeras 6 h podrían ocurrir cambios plásticos relacionados con el contexto o a la fase de consolidación de la memoria, ya que hubo un aumento significativo de la densidad de espinas en los grupos 0.0, 1.0 mA, en comparación con el grupo de SCH en la densidad de espinas dendríticas. Por otra parte, también a las 6 h, se encontró una disminución en las espinas tipo hongo (en comparación con el grupo BIO), provocadas por la exposición únicamente al choque eléctrico, esta disminución resulta en las notables diferencias entre aquellos grupos entrenados con 1.0 y 3.0 mA y el grupo SCH, observándose un mayor número de espinas, pero que no son diferentes de grupo control BIO. Por lo que quizá no hubo un cambio notable en este tipo de espinas en los sujetos entrenados que pudiera estar relacionado con la consolidación de la memoria. Lo mismo podría decirse de las espinas tipo larga en los mismos grupos donde se observa un mayor número de espinas, respecto al grupo SCH, pero no en comparación con el grupo BIO. Para el caso de las espinas tipo corta en el grupo 6 h-3.0 mA es diferente del grupo SCH, las modificaciones para este tipo de espina podrían ya no mantenerse 24 h después, cabe recordar que este tipo de espinas son más inmaduras y a su vez más susceptibles a sufrir modificaciones que el resto (Harris et al., 1992). A excepción de las espinas tipo hongo, estos resultados podrían concordar con aquellos de Moench y colaboradores (2016), quienes encontraron que la sola exposición a un estresor (restricción de movimiento) no ocasiona modificaciones en las espinas, pero sí en la morfología dendrítica de la neurona, y que las modificaciones encontradas en las espinas en la región IL, estaban asociadas al aprendizaje de extinción en una tarea de condicionamiento, sin embargo, los autores no reportan la cuantificación de espinas o de morfología dendrítica en condiciones basales. Además, encontraron una correlación positiva entre los sujetos que presentan una mayor resistencia a la extinción y la densidad de espinas, la densidad de espinas de tipo corta y tipo hongo, y una correlación negativa con las espinas tipo larga. Considerando lo anterior y tomando en cuenta que los sujetos entrenados con una intensidad de choque de 3.0 mA son más resistentes a la extinción, podríamos encontrarnos en un panorama similar, puesto que nuestros resultados indican que 24 h después del entrenamiento, existe una mayor densidad total de espinas, una menor densidad de las espinas tipo larga (ambas en comparación del grupo BIO) y una mayor densidad de espinas tipo hongo (en comparación con el grupo 0.0 mA). Sería pertinente evaluar si las modificaciones encontradas en nuestro trabajo se atribuyen a la MLP, al proceso de evocación o a una fase inicial de extinción.

Otro punto que se debe considerar, es que mientras que las capas superficiales (II-III) de la región IL recibe información de regiones para-hipocampales como la corteza entorrinal y peririnal (Delatour y Witter, 2002), la capa V de esta región recibe información glutaminérgica de hipocampo (Mulder et al., 1997), además, esta capa proyecta al NAc y estriado dorsomedial (Carr et al., 1999; McGeorge y Faull, 1989), en esta última región se encontraron modificaciones en las espinas dendríticas relacionadas con el entrenamiento de la tarea de EI, y que además los cambios encontrados en densidad y presencia de espinas tipo hongo podrían estar correlacionados con la intensidad del entrenamiento (Bello-Medina et al., 2016). Por lo que quizás al evaluar la capa V, podríamos encontrar modificaciones que pudieran estar más asociadas a la memoria de esta tarea. Además, recientemente se ha determinado el papel de la dopamina mesocortical en el procesamiento de eventos aversivos (Weele et al., 2018) y también se sabe que las terminales dopaminérgicas llegan principalmente a las regiones distales de esta capa y de la capa II-III (Carr et al., 1999; Douglas y Martin, 2004). Por lo que para tener un panorama más amplio de lo que podría ocurrir en esta región y su participación en la memoria de EI, no solo se deben estudiar las regiones o las capas de la CPFm, sino también las proyecciones dendríticas apicales y basales, así como las porciones distales o proximales de cada proyección también deben ser tomadas en cuenta para futuras investigaciones.

Los resultados obtenidos de la inactivación de la región IL resultaron un tanto complejos para interpretación. Se ha sugerido que la región IL juega un papel importante en la mediación de las conductas inhibitorias y su asociación con estímulos aversivos, por lo tanto, al tratarse de la tarea de EI esperábamos que al inactivar esta región encontraríamos déficits en la consolidación de esta tarea, tal como se ha observado en estudios previos (Jinks y McGregor, 1997). El primer resultado que llamó nuestra atención fue que el entrenamiento con intensidad alta de choque eléctrico no protege del efecto amnésico provocado por la TTX en la región IL, efecto que reportado en varios estudios realizados en el laboratorio. La prueba de retención realizada 30 minutos después del entrenamiento nos indicó que el efecto amnésico de la TTX no es debido a un déficit en la adquisición, ya que tuvieron latencias de

retención altas, mientras que, al evaluar 48 h después el mismo grupo se observó un marcado déficit en la MLP.

El resultado que más llamó la atención fue cuando la TTX se administró dos veces (antes del entrenamiento y antes de la prueba de retención), pudimos observar que el efecto amnésico se encontró solo en aquellos sujetos entrenados con intensidad moderada de choque eléctrico y no en el grupo entrenado con intensidad alta. Este resultado nos habla de un efecto denominado “memoria y aprendizaje dependiente de estado”, el cual se define como aquellas experiencias en las cuales los sujetos aprenden habilidades o relaciones entre diferentes estímulos bajo la influencia de alguna droga. La probabilidad de evocar o recuperar la memoria de este tipo de experiencias es mayor cuando se encuentra bajo el mismo estado farmacológico (Radulovic et al., 2017). Hasta ahora, parece ser que este es el primer reporte donde se encuentra dependencia de estado asociada a estructuras corticales. Una vez obtenido este resultado y para tratar de discernir el papel de la región IL en la consolidación de la memoria, la TTX se administró inmediatamente después del entrenamiento. Esta manipulación reveló que el efecto de la inactivación de esta región es similar al que ya hemos observado en estudios previos, el entrenamiento intenso protege a la memoria de tratamientos que suelen provocar amnesia, en este caso el efecto de la inactivación con TTX.

La mayoría de los estudios realizados en la región IL se han centrado en su participación en la extinción de tareas de condicionamiento. A diferencia de la tarea de evitación inhibitoria, en el condicionamiento de miedo el estresor no es controlable y conlleva una respuesta pasiva (congelamiento), mientras que, en la tarea de EI, al presentar el componente clásico e instrumental, demanda respuestas conductuales competitivas que deben ser ajustadas para que el sujeto pueda evitar con éxito el estímulo aversivo. Ya en reportes previos se ha demostrado que la respuesta de EI no está asociada a una conducta de miedo o congelamiento (Garín-Aguilar et al., 2014), por lo tanto, en este paradigma puede disociarse la respuesta ante el estresor. En trabajos realizados por Amat et al. (2005; 2006) han demostrado que cuando un estresor es controlable (como sería el caso de la tarea de EI), la activación que usualmente se induce por estrés en el núcleo dorsal del rafe (DNR) y locus cerúleos es inhibida por la región IL, y las respuestas conductuales que se manifestarían ante

un estresor incontrolable se bloquean. Esto sugiere una nueva función para la IL e implica el control sobre los núcleos del tronco encefálico. Además, al evaluar los niveles de CORT 15 minutos después del entrenamiento, se puede observar un incremento mayor de la hormona en el grupo TTX-3.0 mA, este es un dato interesante, puesto que diversos estudios han sugerido que tanto la región PL e IL podrían tener una participación en la regulación del eje HHA y que estas, juegan papeles opuestos, proponiendo que una disminución en la actividad de la región PL promueve la liberación en CORT y conductas angiogénicas, mientras que la inhibición de la región IL promueve una disminución de esta hormona en sangre, promoviendo respuestas ansiolíticas (Radley, 2012), incluso, este efecto sobre el eje HHA se ha relacionado con la respuesta de extinción en tareas de condicionamiento de miedo (Bloodgood et al., 2018; Gilmartin et al., 2014; Giustino y Maren, 2015b; Vidal-Gonzalez et al., 2006). Sin embargo, recientemente han salido a la luz datos en otros paradigmas conductuales que no corresponden a los usualmente observados en condicionamiento de miedo, tal es el caso del trabajo realizado por Shimizu y colaboradores (2018), quienes al realizar una estimulación eléctrica de la región IL observaron efectos ansiolíticos, evaluados mediante el paradigma de laberinto elevado, y concluyendo que la IL desempeña un papel clave para superar conductas asociadas a la ansiedad. Esto implicaría que los sistemas para ejecutar, adquirir y/o almacenar la información dependerían del tipo de evento aversivo, para el caso de la tarea de EI, la región IL, podría estar relacionada con la regulación de los niveles de corticosterona para el adecuado almacén de la información, cuando se trata de una intensidad moderada.

### **7.3.1. REGIÓN INFRALÍMBICA Y DEPENDENCIA DE ESTADO**

Los resultados mostraron que existe dependencia de estado únicamente en aquellos sujetos a los que se les administró la TTX en la región IL y que fueron entrenados con una intensidad de 3 mA. El aprendizaje dependiente de estado fue descrito inicialmente por Girden y Culler (1937) para referirse a aquel fenómeno en el cual la información que se adquiere bajo determinado estado farmacológico es mejor evocada bajo la influencia de un estado

farmacológico similar. Sin embargo, se ha descrito que ciertos estímulos exógenos (drogas, estimulación eléctrica, contexto) y endógenos (estados de ánimo, motivación, hormonas, ritmos circadianos) también podrían ser capaces de producir la dependencia de estado (Young, 2010). Existen reportes de que diferentes agentes farmacológicos producen efecto de aprendizaje dependiente de estado, tales como drogas de abuso (alcohol, marihuana, opiáceos) (Ahlers et al., 1991; Izquierdo y McGaugh, 1987; Zarrindast y Rezayof, 2004), ansiolíticos (Dizepam, Valium) (Bouton et al., 1990; Izquierdo y Ferreira, 1989) y fármacos ampliamente utilizados para el estudio de la memoria, como escopolamina (Berger y Stein, 1969), pentobarbital (Overton, 1964) y el antagonista al receptor NMDA, MK-801 (Ceretta et al., 2008; Flint et al., 2013), hasta ahora no había reportes de que la TTX provocara dependencia de estado. Por otra parte, pocos estudios han demostrado la participación de distintas regiones cerebrales en el aprendizaje dependiente de estado en la tarea de EI, la mayoría de los estudios se han centrado en el estudio del hipocampo dorsal (Jafari-Sabet et al., 2013; Jamali-Raeufy et al., 2011; Rezayof et al., 2008). Algunos de los primeros estudios en aprendizaje dependiente de estado, demostraron que la estimulación eléctrica de baja intensidad en regiones cerebrales, como el núcleo caudado y el hipocampo, es suficiente para provocar dependencia de estado, mientras que en la amígdala se requiere de una estimulación mayor (McIntyre et al., 1985; Phillips y LePiane, 1981), este sería el primer reporte donde se vincula una estructura cortical en el aprendizaje dependiente de estado. Además, puesto que existen reportes donde la administración de ACTH y dexametasona provocan dependencia de estado en ratas macho en la tarea de evitación inhibitoria (Gray, 1975; Heinsbroek et al., 1984; Izquierdo y Dias, 1983), sería necesario evaluar los niveles de corticosterona en aquellos sujetos a los que se les administró la TTX antes de la prueba y que fueron entrenados con intensidad alta para determinar si existe alguna relación de los niveles de la hormona con la dependencia de estado. Ya que como se observa en la Figura 20, los niveles CORT fueron mayores en el grupo TTX entrenado con 3.0 mA.

Es necesario tomar en cuenta que el aprendizaje dependiente del estado ha sido definido de manera operacional como una interacción específica entre el efecto del tratamiento en el entrenamiento y su efecto en la prueba. Hasta ahora las bases

neurofisiológicas de este fenómeno no han sido tomadas en consideración. Además, debería ser una prueba necesaria en aquellos estudios enfocados en el aprendizaje y la memoria puesto que evitaría malas interpretaciones de los resultados.

Para finalizar, varios factores deben ser tomados en consideración para las discrepancias encontradas en el efecto de la inhibición de las distintas regiones de la corteza en referencia a trabajos previos, como el tamaño de la lesión, la naturaleza de la tarea (condicionamiento clásico u operante), intensidad de entrenamiento, especie animal e incluso la cepa y sexo de la rata en la que se realiza el estudio (Chang y Maren, 2010; Heinsbroek et al., 1984). Además, nuestros resultados podrían apoyar la idea de que las regiones IL y PL no juegan papeles o puestos, sino que podrían presentar roles disociativos que podrían depender de la conducta a evaluar, contexto, el estresor y de ciertas condiciones experimentales, tal como lo ha planteado (Moench et al., 2016; Shimizu et al., 2018). Sin embargo, aún queda sin resolver, de qué mecanismos moleculares o de qué sistemas se vale el organismo para poder recordar un evento altamente aversivo, aun cuando es interferido química y estructuralmente en elementos considerados como claves para la memoria. Este fenómeno podría resultar adaptativo para los organismos, no obstante, cuando tratamos con sujetos intactos, tratar las situaciones que ya no resultan amenazantes como peligrosas podrían resultar en todo lo contrario, llevando a conductas mal adaptativas como aquellas observadas en ansiedad, fobias, depresión o estrés postraumático.

---

## 8. CONCLUSIONES

---

Con los datos obtenidos en esta serie experimental indican que:

- (a) La cuantificación de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales capa II-III de las regiones ACa, PL e IL no arrojaron información suficiente para determinar su relación con la consolidación de la MLP de la tarea de EI;
- (b) La consolidación de la memoria de EI no depende de la actividad neuronal del ACa;
- (c) La actividad de la región PL es esencial para la consolidación de la memoria de EI en condiciones de entrenamiento moderado, no así para la consolidación en condiciones de entrenamiento intenso;
- (d) La actividad de la región IL también es esencial para la consolidación de la memoria de EI en condiciones de entrenamiento moderada, pero no para la consolidación en condiciones de entrenamiento intenso. Por otra parte, el efecto combinado de TTX y de entrenamiento intenso induce el efecto de dependencia del estado.
- (e) La inhibición de la actividad de la región IL provoca un incremento mayor en los niveles de CORT.



---

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Abel, T., Lattal, K. M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(2), 180–187. doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00194-X
- Ahlers, S. T., Gordon, T. L., Riccio, D. C. (1991). The effects of preexposure to the drug on state dependent retention. *Physiology and Behavior*, 50(2), 365–371. doi.org/10.1016/0031-9384(91)90079-4
- Amat, J., Baratta, M. V., Paul, E., Bland, S. T., Watkins, L. R., Maier, S. F. (2005). Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nature Neuroscience*, 8(3), 365–371. doi.org/10.1038/nn1399
- Amat, J., Paul, E., Zarza, C., Watkins, L. R., Maier, S. F. (2006). Previous Experience with Behavioral Control over Stress Blocks the Behavioral and Dorsal Raphe Nucleus Activating Effects of Later Uncontrollable Stress: Role of the Ventral Medial Prefrontal Cortex. *Journal of Neuroscience*, 26(51), 13264–13272. doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3630-06.2006
- Ambrogio-Lorenzini, C. G., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., Tassoni, G. (1999). Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiology of learning and memory*, 71, 1–18. doi.org/10.1006/nlme.1998.3865
- Arellano, J. I. (2007). Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Frontiers in Neuroscience*. doi.org/10.3389/neuro.01.1.1.010.2007
- Bello-medina, P. C., Flores, G., Quirarte, G. L., Mcgaugh, J. L., Prado, R. A. (2016). Mushroom spine dynamics in medium spiny neurons of dorsal striatum associated with memory of moderate and intense training. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1–10. doi.org/10.1073/pnas.1613680113
- Bellot, A., Guivernau, B., Tajés, M., Bosch-Morató, M., Valls-Comamala, V., Muñoz, F. J. (2014). The structure and function of actin cytoskeleton in mature glutamatergic dendritic spines. *Brain Research*. doi.org/10.1016/j.brainres.2014.05.024

- Berger, B. D., Stein, L. (1969). An analysis of the learning deficits produced by scopolamine. *Psychopharmacologia*, 14(4), 271–283. doi.org/10.1007/BF02190112
- Bernabeu, R. (1997). Involvement of hippocampal AMPA glutamate receptor changes and the cAMP / protein kinase A / CREB-P signaling pathway in memory consolidation of an avoidance task in rats, 30, 961–965.
- Bero, A. W., Meng, J., Cho, S., Shen, A. H., Canter, R. G., Ericsson, M., Tsai, L.-H. (2014). Early remodeling of the neocortex upon episodic memory encoding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(32), 11852–11857. doi.org/10.1073/pnas.1408378111
- Bissière, S., Plachta, N., Hoyer, D., McAllister, K. H., Olpe, H. R., Grace, A. A., Cryan, J. F. (2008). The Rostral Anterior Cingulate Cortex Modulates the Efficiency of Amygdala-Dependent Fear Learning. *Biological Psychiatry*, 63(9), 821–831. doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.10.022
- Bliss T, L. T. (1973). Hill, Neurophysiology, of. *J.Physiol.*, 331–356. doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273
- Bloodgood, D. W., Sugam, J. A., Holmes, A., Kash, T. L. (2018). Fear extinction requires infralimbic cortex projections to the basolateral amygdala. *Translational Psychiatry*, 8(1). doi.org/10.1038/s41398-018-0106-x
- Blum, S., Hebert, A. E., Dash, P. K. (2006). A role for the prefrontal cortex in recall of recent and remote memories. *Neuroreport*, 17(3), 341–344. doi.org/10.1097/01.wnr.0000201509.53750.bc
- Boehnke, S. E., Rasmusson, D. D. (2001). Time course and effective spread of lidocaine and tetrodotoxin delivered via microdialysis: An electrophysiological study in cerebral cortex. *Journal of Neuroscience Methods*, 105(2), 133–141. doi.org/10.1016/S0165-0270(00)00348-4
- Bosch, M., Hayashi, Y. (2012). Structural plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol*, 22(3), 383–388. doi.org/10.1016/j.conb.2011.09.002
- Bourne, J., Harris, K. M. (2007). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol*, 17(3), 381–386. doi.org/10.1016/j.conb.2007.04.009
- Bouton, M. E., Kenney, F. A., Rosengard, C. (1990). State-dependent fear extinction with

- two benzodiazepine tranquilizers. *Behavioral Neuroscience*, 104(1), 44–55.  
doi.org/10.1037//0735-7044.104.1.44
- Bravo-Rivera, C., Roman-Ortiz, C., Brignoni-Perez, E., Sotres-Bayon, F., Quirk, G. J. (2014). Neural Structures Mediating Expression and Extinction of Platform-Mediated Avoidance. *Journal of Neuroscience*, 34(29), 9736–9742.  
doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0191-14.2014
- Bravo-Rivera, Christian, Roman-Ortiz, C., Montesinos-Cartagena, M., Quirk, G. J. (2015). Persistent active avoidance correlates with activity in prelimbic cortex and ventral striatum. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 9(July), 184.  
doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00184
- Bruce, D. (2001). Fifty Years Since Lashley's In Search of the Engram: Refutations and Conjectures. *Journal of the History of the Neurosciences*, 10(3), 308–318.  
doi.org/10.1076/jhin.10.3.308.9086
- Caceres, A., Payne, M. R., Binder, L. I., Stewart, O. (1983). Immunocytochemical localization of actin and microtubule-associated protein MAP2 in dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.  
doi.org/10.1073/pnas.80.6.1738
- Canto-de-Souza, L., Mattioli, R. (2016). The consolidation of inhibitory avoidance memory in mice depends on the intensity of the aversive stimulus: The involvement of the amygdala, dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex. *Neurobiology of Learning and Memory*, 130, 44–51. doi.org/10.1016/j.nlm.2016.01.012
- Caroni, P., Chowdhury, A., Lahr, M. (2014). Synapse rearrangements upon learning: From divergent-sparse connectivity to dedicated sub-circuits. *Trends in Neurosciences*.  
doi.org/10.1016/j.tins.2014.08.011
- Carr, D. B., Donnell, P. O., Card, J. P., Sesack, S. R. (1999). Dopamine Terminals in the Rat Prefrontal Cortex Synapse on Pyramidal Cells that Project to the Nucleus Accumbens, 19(24), 11049–11060.
- Ceretta, A. P. C., Camera, K., Mello, C. F., Rubin, M. A. (2008). Arcaine and MK-801 make recall state-dependent in rats. *Psychopharmacology*, 201(3), 405–411.  
doi.org/10.1007/s00213-008-1304-7

- Chai, S.-C., Kung, J.-C., Shyu, B.-C. (2010). Roles of the anterior cingulate cortex and medial thalamus in short-term and long-term aversive information processing. *Molecular pain*, 6, 42. doi.org/10.1186/1744-8069-6-42
- Chang, C., Maren, S. (2010). Strain difference in the effect of infralimbic cortex lesions on fear extinction in rats. *Behavioral neuroscience*, 124(3), 391–397. doi.org/10.1037/a0019479
- Chen, C.-C., Lu, J., Zuo, Y. (2014). Spatiotemporal dynamics of dendritic spines in the living brain. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8(May), 1–7. doi.org/10.3389/fnana.2014.00028
- Cingolani, L. A., Goda, Y. (2008). Actin in action: The interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nature Reviews Neuroscience*. doi.org/10.1038/nrn2373
- Cobos-Zapalaín, G. G., Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavez, M., Quirarte, G. L., Roldán-Roldán, G., Díaz del Guante, M. A., Prado-Alcalá, R. A. (1996). High Level of Footshock during Inhibitory Avoidance Training Prevents Amnesia Induced by Intranigral Injection of GABA Antagonists. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65(3), 202–206. doi.org/10.1006/nlme.1996.0024
- Corcoran, K. A., Quirk, G. J. (2007). Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *Journal of Neuroscience*, 27(4), 840–844. doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5327-06.2007
- Courtin, J., Bienvenu, T. C. M., Einarsson, E. ??, Herry, C. (2013). Medial prefrontal cortex neuronal circuits in fear behavior. *Neuroscience*, 240, 219–242. doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.03.001
- Cowan, N. (2008). Chapter 20 What are the differences between long-term, short-term, and working memory? *Progress in Brain Research*. doi.org/10.1016/S0079-6123(07)00020-9
- Cruz-Morales, S. E., Duran-Arevalo, M., Diaz Del Guante, M. A., Quirarte, G., Prado-Alcala, R. A. (1992). A threshold for the protective effect of over-reinforced passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Behav Neural Biol*, 57(3), 256–259.
- Dahlgren, M. K., Laifer, L. M., VanElzakker, M. B., Offringa, R., Hughes, K. C., Staples-Bradley, L. K., ... Shin, L. M. (2018). Diminished medial prefrontal cortex activation

- during the recollection of stressful events is an acquired characteristic of PTSD. *Psychological Medicine*, 48(7), 1128–1138. doi.org/10.1017/S003329171700263X
- Dalley, J. W., Cardinal, R. N., Robbins, T. W. (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: Neural and neurochemical substrates. En *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.09.006
- De Roo, M., Klauser, P., Mendez, P., Poglia, L., Muller, D. (2008). Activity-dependent PSD formation and stabilization of newly formed spines in hippocampal slice cultures. *Cerebral Cortex*. doi.org/10.1093/cercor/bhm041
- Delatour, B., Witter, M. P. (2002). Projections from the parahippocampal region to the prefrontal cortex in the rat : evidence of multiple pathways, *15*, 1400–1407.
- Derkach, V. A., Oh, M. C., Guire, E. S., Soderling, T. R. (2007). Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*. doi.org/10.1038/nrn2055
- Díaz-Trujillo, A., Contreras, J., Medina, A. C., Silveyra-Leon, G. A., Antaramian, A., Quirarte, G. L., Prado-Alcalá, R. A. (2009). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. *Neurobiology of Learning and Memory*, 91(3), 310–314. doi.org/10.1016/j.nlm.2008.10.006
- Douglas, R. J., Martin, K. A. C. (2004). Neuronal Circuits of the Neocortex. *Annual Review of Neuroscience*, 27(1), 419–451. doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144152
- Dresselhaus, E. C., Boersma, M. C. H., Meffert, M. K. (2018). Targeting of NF-κB to Dendritic Spines Is Required for Synaptic Signaling and Spine Development. *The Journal of Neuroscience*. doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2663-16.2018
- Dudai, Y. (1989). *The neurobiology of memory. Concepts, finding, trends*. Estados Unidos: Oxford University Press.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol*, 55, 51–86. doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050
- Dudai, Y. (2002). Molecular bases of long-term memories: A question of persistence. *Current Opinion in Neurobiology*. doi.org/10.1016/S0959-4388(02)00305-7
- Dudai, Y. (2012). The Restless Engram: Consolidations Never End. *Annual Review of*

*Neuroscience*. doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150500

- Dudai, Y., Morris, R. G. M. (2000). To consolidate or not to consolidate: what are the questions? En *Brain, Perception, Memory Advances in Cognitive Neuroscience*. doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198524823.003.0011
- Duran-Arevalo, M., Cruz-Morales, S. E., Prado-Alcala, R. A. (1990). Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Res Bull*, 24(6), 725–727.
- Euston, D. R., Gruber, A. J., Mcnaughton, B. L. (2013). The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. *Neuron*, 76(6), 1057–1070. doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.002.The
- Fiala, J. C., Spacek, J., Harris, K. M. (2012). Dendrite structure. En *Dendrites*. doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198566564.003.0001
- Flint, R. W., Noble, L. J., Ulmen, A. R. (2013). NMDA receptor antagonism with MK-801 impairs consolidation and reconsolidation of passive avoidance conditioning in adolescent rats: Evidence for a state dependent reconsolidation effect. *Neurobiology of Learning and Memory*, 101, 114–119. doi.org/10.1016/j.nlm.2013.01.009
- Frankfurt, M., Luine, V. (2015). The evolving role of dendritic spines and memory: Interaction(s) with estradiol. *Hormones and Behavior*. doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.05.004
- Fu, M., Zuo, Y. (2011). Experience-dependent structural plasticity in the cortex. *Trends Neurosci*, 34(4), 177–187. doi.org/10.1016/j.tins.2011.02.001
- Galindo, L. E., Garín-Aguilar, M. E., Medina, A. C., Serafín, N., Quirarte, G. L., Prado-Alcalá, R. A. (2008). Acquisition and retention of enhanced active avoidance are unaffected by interference with serotonergic activity. *Behavioural Brain Research*. doi.org/10.1016/j.bbr.2008.01.011
- Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Cintra, S., Quirarte, G. L., Aguilar-Vázquez, A., Medina, A. C., Prado-Alcalá, R. A. (2012). Extinction procedure induces pruning of dendritic spines in CA1 hippocampal field depending on strength of training in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6(March), 1–6. doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00012
- Garín-Aguilar, M. E., Medina, A. C., Quirarte, G. L., Mcgaugh, J. L., Prado-Alcalá, R. A.

- (2014). Intense aversive training protects memory from the amnesic effects of hippocampal inactivation. *Hippocampus*, 24(1), 102–112. doi.org/10.1002/hipo.22210
- Garrido, P., de Blas, M., del Arco, A., Segovia, G., Mora, F. (2012). Aging increases basal but not stress-induced levels of corticosterone in the brain of the awake rat. *Neurobiology of Aging*, 33(2), 375–382. doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.02.015
- Gilmartin, M. R., Balderston, N. L., Helmstetter, F. J. (2014). Prefrontal cortical regulation of fear learning. *Trends in Neuroscince*, 37(8), 455–464.
- Giordano, M., Prado-Alcalá, R. A. (1986). Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudateputamen. Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 24, 905–909. doi.org/10.1016/0091-3057(86)90435-1
- Girden, E., Culler, E. (1937). Conditioned responses in curarized striate muscle in dogs. *Journal of Comparative Psychology*, 23(2), 261–274. doi.org/10.1037/h0058634
- Giustino, T. F., Maren, S. (2015a). The Role of the Medial Prefrontal Cortex in the Conditioning and Extinction of Fear. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 9, 298. doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00298
- Giustino, T. F., Maren, S. (2015b). The Role of the Medial Prefrontal Cortex in the Conditioning and Extinction of Fear. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9(November), 1–20. doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00298
- González- Franco, D. A., Ramírez-Amaya, V., Joseph-Bravo, P., Prado-Alcalá, R. A., Quirarte, G. L. (2017). Differential Arc protein expression in dorsal and ventral striatum after moderate and intense inhibitory avoidance training. *Neurobiology of Learning and Memory*. doi.org/10.1016/j.nlm.2017.02.001
- Gonzalez, M. C., Kramar, C. P., Tomaiuolo, M., Kathe, C., Weisstaub, N., Cammarota, M., Medina, J. H. (2014). Medial prefrontal cortex dopamine controls the persistent storage of aversive memories. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8(November), 408. doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00408
- Gray, P. (1975). Effect of adrenocorticotrophic hormone on conditioned avoidance in rats interpreted as state dependent learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 88(1), 281–284.

- Harris, K M, Jensen, F. E., Tsao, B. (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci*, 12(7), 2685–2705.
- Harris, K. M. (1999). Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Current Opinion in Neurobiology*. doi.org/10.1016/S0959-4388(99)80050-6
- Hebb, D. O. (1949). *The Organization of Behavior. A Neuropsychological Theory*. 1949. Wiley, New York.
- Heinsbroek, R. P. W., van Oyen, H. G., van de Poll, N. E. (1984). The pituitary-adrenocortical system is not involved in the sex difference in passive avoidance. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 20(5), 663–668. doi.org/10.1016/0091-3057(84)90181-3
- Herrera, D. G., Robertson, H. A. (1996). Activation of c-fos in the brain. *Progress in Neurobiology*. doi.org/10.1016/S0301-0082(96)00021-4
- Holloway, C. M., McIntyre, C. K. (2011a). Post-training disruption of Arc protein expression in the anterior cingulate cortex impairs long-term memory for inhibitory avoidance training. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95(4), 425–432. doi.org/10.1016/j.nlm.2011.02.002
- Holloway, C. M., McIntyre, C. K. (2011b). Post-training disruption of Arc protein expression in the anterior cingulate cortex impairs long-term memory for inhibitory avoidance training. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95(4), 425–432. doi.org/10.1016/j.nlm.2011.02.002
- Holtmaat, A., Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nature Reviews Neuroscience*. doi.org/10.1038/nrn2699
- Igaz, L. M., Vianna, M. R. M., Medina, J. H., Izquierdo, I. (2002). Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(15), 6781–6789. doi.org/20026642
- Izquierdo, I, McGaugh, J. L. (1987). Retention impairment by posttraining epinephrine: role of state dependency and of endogenous opioid mechanisms. *Behavioral Neuroscience*,



101(6), 778–781. doi.org/10.1037/0735-7044.101.6.778

- Izquierdo, I., McGaugh, J. L. (2000). Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behavioural pharmacology*, 11(7–8), 517–534. doi.org/10.1097/00008877-200011000-00001
- Izquierdo, I., Dias, R. D. (1983). Memory as a state dependent phenomenon: Role of ACTH and epinephrine. *Behavioral and Neural Biology*, 38(1), 144–149. doi.org/10.1016/S0163-1047(83)90519-8
- Izquierdo, I., Ferreira, M. B. C. (1989). Diazepam prevents post-training drug effects related to state dependency, but not post-training memory facilitation by epinephrine. *Behavioral and Neural Biology*, 51(1), 73–79. doi.org/10.1016/S0163-1047(89)90673-0
- Jafari-Sabet, M., Banafshe, H. R., Khodadadnejad, M. A. (2013). Modulation of muscimol state-dependent memory by  $\alpha_2$ -adrenoceptors of the dorsal hippocampal area. *European Journal of Pharmacology*, 710(1–3), 92–99. doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.03.046
- Jamali-Raeufy, N., Nasehi, M., Ebrahimi-ghiri, M., Zarrindast, M. R. (2011). Cross state-dependency of learning between WIN55, 212-2 and scopolamine in rat dorsal hippocampus. *Neuroscience Letters*, 491(3), 227–231. doi.org/10.1016/j.neulet.2011.01.056
- Jinks, A. L., McGregor, I. S. (1997). Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. *Brain Research*, 772(1–2), 181–190. doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00810-X
- Kandel, E R, Schwartz, J., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., Hudspeth, A. J. (2013). *Principles of Neural Science* (5a ed.). McGraw-Hill.
- Kandel, Eric R. (2001). The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue between Genes and Synapses. *Science*, 294(5544), 1030–1038. doi.org/10.1126/science.1067020
- Kawaguchi, Y., Karube, F., Kubota, Y. (2006). Dendritic branch typing and spine expression patterns in cortical nonpyramidal cells. *Cerebral Cortex*. doi.org/10.1093/cercor/bhj015
- Kelly, P. T., McGuinness, T. L., Greengard, P. (1984). Evidence that the major postsynaptic

- density protein is a component of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi.org/10.1073/pnas.81.3.945
- Kitamura, T., Ogawa, S. K., Roy, D. S., Okuyama, T., Morrissey, M. D., Smith, L. M., ... Tonegawa, S. (2017). Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science*. doi.org/10.1126/science.aam6808
- Lázaro-Muñoz, G., LeDoux, J. E., Cain, C. K. (2010). Sidman Instrumental Avoidance Initially Depends on Lateral and Basal Amygdala and Is Constrained by Central Amygdala-Mediated Pavlovian Processes. *Biological Psychiatry*. doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.12.002
- Lorenzini, C. A., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., Tassoni, G. (1996). Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: A tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Research*, 730(1–2), 32–39. doi.org/10.1016/S0006-8993(96)00427-1
- Malin, E. L., McGaugh, J. L. (2006). Differential involvement of the hippocampus, anterior cingulate cortex, and basolateral amygdala in memory for context and footshock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(6), 1959–1963. doi.org/10.1073/pnas.0510890103
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R., Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*. doi.org/10.1038/nature02617
- McGaugh, J. L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248–251. doi.org/10.1126/science.287.5451.248
- McGeorge, A. J., Faull, R. L. M. (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat, 29(3), 503–537.
- McIntyre, D. C., Stenstrom, R. J., Taylor, D., Stokes, K. A., Edson, N. (1985). State-dependent learning following electrical stimulation of the hippocampus: Intact and split-brain rats. *Physiology and Behavior*, 34(1), 133–139. doi.org/10.1016/0031-9384(85)90091-5
- McReynolds, J. R., Holloway-Erickson, C. M., Parmar, T. U., McIntyre, C. K. (2014). Corticosterone-induced enhancement of memory and synaptic Arc protein in the medial

- prefrontal cortex. *Neurobiology of Learning and Memory*, 112, 148–157. doi.org/10.1016/j.nlm.2014.02.007
- Medvedev, N. I., Dallérac, G., Popov, V. I., Rodriguez Arellano, J. J., Davies, H. A., Kraev, I. V., ... Stewart, M. G. (2014). Multiple spine boutons are formed after long-lasting LTP in the awake rat. *Brain Structure and Function*. doi.org/10.1007/s00429-012-0488-0
- Mello e Souza, T., Roesler, R., Madruga, M., de-Paris, F., Quevedo, J., Rodrigues, C., ... Izquierdo, I. (1999). Differential effects of post-training muscimol and AP5 infusions into different regions of the cingulate cortex on retention for inhibitory avoidance in rats. *Neurobiology of learning and memory*, 72(2), 118–127. doi.org/10.1006/nlme.1998.3892
- Moench, K. M., Maroun, M., Kavushansky, A., Wellman, C. (2016). Alterations in neuronal morphology in infralimbic cortex predict resistance to fear extinction following acute stress. *Neurobiology of Stress*, 3, 23–33. doi.org/10.1016/j.ynstr.2015.12.002
- Moench, K. M., Wellman, C. L. (2017). Differential dendritic remodeling in prelimbic cortex of male and female rats during recovery from chronic stress. *Neuroscience*, (June). doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.05.049
- Morgado, I. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria: Fundamentos y avances recientes. *Revista de Neurología*, 40(5), 289–297.
- Mulder, A. B., Arts, M. P. M., Silva, F. H. L. (1997). Short- and Long-term Plasticity of the Hippocampus to Nucleus Accumbens and Prefrontal Cortex Pathways in the Rat , In *Wvo*, 9(August 1996), 1603–1611.
- Müller, G. E., Pilzecker, A. (1900). Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtniss [Experimental contributions to the science of memory]. *Zeitschrift für Psychologie*. doi.org/10.1037/11531-002
- Murakoshi, H., Yasuda, R. (2012). Postsynaptic signaling during plasticity of dendritic spines. *Trends in Neurosciences*. doi.org/10.1016/j.tins.2011.12.002
- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals* (8th ed.). Washington (DC): National Academies Press (US).

- O'Sullivan, N. C., McGettigan, P. A., Sheridan, G. K., Pickering, M., Conboy, L., O'Connor, J. J., ... Murphy, K. J. (2007). Temporal change in gene expression in the rat dentate gyrus following passive avoidance learning. *Journal of Neurochemistry*. doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04418.x
- Overton, D. A. (1964). State-dependent or "Dissociated" learning produced with pentobarbital. *Journal of comparative and physiological psychology*, 57(1), 3–12. doi.org/10.1037/h0048023
- Parent, M. B., West, M., McGaugh, J. L. (1994). Memory of rats with amygdala lesions induced 30 days after footshock- motivated escape training reflects degree of original training. *Behavioral Neuroscience*. doi.org/10.1037/0735-7044.108.6.1080
- Parent, M. B., Tomaz, C., McGaugh, J. L. (1992). Increased Training in an Aversively Motivated Task Attenuates the Memory-Impairing Effects of Posttraining N-Methyl-D-Aspartate-Induced Amygdala Lesions. *Behavioral Neuroscience*. doi.org/10.1037/0735-7044.106.5.789
- Paxinos, G., Watson, C. G. (2007). *The Rat Brain in stereotaxic coordinates* (6a ed.). Academic Press.
- Pérez-Ruiz, C., Prado-Alcalá, R. A. (1989). Retrograde amnesia induced by lidocaine injection into the striatum: Protective effect of the negative reinforcer. *Brain Research Bulletin*. doi.org/10.1016/0361-9230(89)90076-2
- Persohn, E., Schachner, M. (1990). Immunohistological localization of the neural adhesion molecules L1 and N-CAM in the developing hippocampus of the mouse. *Journal of Neurocytology*. doi.org/10.1007/BF01186812
- Peters, A., Kaiserman-Abramof, I. R. (1970). The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *American Journal of Anatomy*. doi.org/10.1002/aja.1001270402
- Phelps, E. A., LeDoux, J. E. (2005). Contributions of the amygdala to emotion processing: From animal models to human behavior. *Neuron*. doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.025
- Phillips, A. G., LePiane, F. G. (1981). Differential effects of electrical stimulation of amygdala or caudate on inhibitory shock avoidance: A role for state-dependent learning. *Behavioural Brain Research*, 2(1), 103–111. doi.org/10.1016/0166-4328(81)90040-1

- Piri, M., Zarrindast, M. R. (2011). Modulation of WIN55,212-2 state-dependent memory by  $\alpha$ 2- adrenergic receptors of the dorsal hippocampus. *Archives of Iranian Medicine*, 14(6), 389–395. doi.org/011146/AIM.007
- Pitman, R., Rasmusson, A., Koenen, K., Shin, L., Orr, S., Gilbertson, M., ... Liberzon, I. (2012). Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(November), 769–787. doi.org/10.1038/nrn3339
- Prado-Alcalá, R. A., Cobos-Zapíaín, G. G. (1977). Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a function of experience. *Brain Research*. doi.org/10.1016/0006-8993(77)90797-1
- Prado-Alcalá, R. A., Diaz Del Guante, M. A., Garin-Aguilar, M. E., Diaz-Trujillo, A., Martínez, G. M. A., Quirarte, G. (2007). Reorganización cerebral inducida por la experiencia incrementada de aprendizaje. En R. de Celis Carrillo (Ed.), *Investigación en neurociencias* (pp. 221–227). México: Bios Médica Editores y Diseños.
- Prado-Alcalá, R. A., Quirarte, G. L. (2007). The consolidation of memory, one century on. *Revista De Neurologia*, 45(5), 284–292.
- Prado-Alcalá, R. A., Haiek, M., Rivas, S., Roldan-Roldan, G., Quirarte, G. L. (1994). Reversal of extinction by scopolamine. *Physiology and Behavior*, 56(1), 27–30. doi.org/10.1016/0031-9384(94)90257-7
- Prado-Alcalá, R. A., Kaufmann, P., Moscona, R. (1980). Scopolamine and KCl injections into the caudate nucleus. Overtraining-induced protection against deficits of learning. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. doi.org/10.1016/0091-3057(80)90364-0
- Prado-Alcalá, R. A., Medina, A. C., Lopez, N. S., Quirarte, G. L. (2012). Intense emotional experiences and enhanced training prevent memory loss induced by post-training amnesic treatments administered to the striatum, amygdala, hippocampus or substantia nigra. *Rev Neurosci*, 23(5–6), 501–508. doi.org/10.1515/revneuro-2012-0061
- Quirk, G. J., Mueller, D. (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(1), 56–72. doi.org/10.1038/sj.npp.1301555
- Quiroz, C., Martínez, I., Quirarte, G. L., Morales, T., Díaz-Cintra, S., Prado-Alcalá, R. A. (2003). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects

- of post-training hippocampal inactivation. *Experimental Brain Research*, 153(3), 400–402. doi.org/10.1007/s00221-003-1704-1
- Radley, J.J., Arias, C. M., Sawchenko, P. E. (2006). Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *J Neurosci*, 26(50), 12967–12976. doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4297-06.2006
- Radley, J. J., Rocher, A. B., Rodriguez, A., Ehlenberger, D. B., Mark, D., McEwen, B., ... Hof, P. (2007). Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 507(1), 1141–1150. doi.org/doi:10.1002/cne.21588
- Radley, J. J. (2012). Toward a limbic cortical inhibitory network: implications for hypothalamic-pituitary-adrenal responses following chronic stress. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 6(March), 7. doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00007
- Radulovic, J., Jovasevic, V., Meyer, M. A. (2017). Neurobiological mechanisms of state-dependent learning. *Current Opinion in Neurobiology*, 45, 92–98. doi.org/10.1016/j.conb.2017.05.013
- Ramirez-Amaya, V. (2005). Spatial Exploration-Induced Arc mRNA and Protein Expression: Evidence for Selective, Network-Specific Reactivation. *Journal of Neuroscience*. doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4342-04.2005
- Restivo, L., Vetere, G., Bontempi, B., Ammassari-Teule, M. (2009). The Formation of Recent and Remote Memory Is Associated with Time-Dependent Formation of Dendritic Spines in the Hippocampus and Anterior Cingulate Cortex. *Journal of Neuroscience*, 29(25), 8206–8214. doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0966-09.2009
- Rezayof, A., Alijanpour, S., Zarrindast, M. R., Rassouli, Y. (2008). Ethanol state-dependent memory: Involvement of dorsal hippocampal muscarinic and nicotinic receptors. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(4), 441–447. doi.org/10.1016/j.nlm.2007.10.011
- Reznikov, R., Bambico, F. R., Diwan, M., Raymond, R. J., Nashed, M. G., Nobrega, J. N., Hamani, C. (2018). Prefrontal Cortex Deep Brain Stimulation Improves Fear and Anxiety-Like Behavior and Reduces Basolateral Amygdala Activity in a Preclinical Model of Posttraumatic Stress Disorder. *Neuropsychopharmacology*, 43(5), 1099–

1106. doi.org/10.1038/npp.2017.207

- Riekkinen, P., Kuitunen, J., Riekkinen, M. (1995). Effects of scopolamine infusions into the anterior and posterior cingulate on passive avoidance and water maze navigation. *Brain Research*, 685(1–2), 46–54. doi.org/10.1016/0006-8993(95)00422-M
- Rocheffort, N. L., Konnerth, A. (2012). Dendritic spines: From structure to in vivo function. *EMBO Reports*. doi.org/10.1038/embor.2012.102
- Russo, M. F., Ah Loy, S. R., Battle, A. R., Johnson, L. R. (2016). Membrane Associated Synaptic Mineralocorticoid and Glucocorticoid Receptors Are Rapid Regulators of Dendritic Spines. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. doi.org/10.3389/fncel.2016.00161
- Sacchetti, B., Baldi, E., Lorenzini, C. A., Bucherelli, C. (2003). Role of the neocortex in consolidation of fear conditioning memories in rats. *Experimental Brain Research*, 152(3), 323–328. doi.org/10.1007/s00221-003-1534-1
- Sagar, S. M., Sharp, F. R., Curran, T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: Metabolic mapping at the cellular level. *Science*. doi.org/10.1126/science.3131879
- Sala, C., Segal, M. (2014). Dendritic Spines: The Locus of Structural and Functional Plasticity. *Physiological Reviews*, 94(1), 141–188. doi.org/10.1152/physrev.00012.2013
- Salado-Castillo, R., Sanchez-Alavez, M., Quirarte, G. L., Martinez Garcia, M. I., Prado-Alcala, R. A. (2011). Enhanced training protects memory against amnesia produced by concurrent inactivation of amygdala and striatum, amygdala and substantia nigra, or striatum and substantia nigra. *Frontiers in Behavioural Neuroscience*, 5, 83. doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00083
- Santos-Anderson, R. M., Routtenberg, A. (1976). Stimulation of rat medial or sulcal prefrontal cortex during passive avoidance learning selectively influences retention performance. *Brain Research*. doi.org/10.1016/0006-8993(76)90797-6
- Schratt, G. M., Tuebing, F., Nigh, E. A., Kane, C. G., Sabatini, M. E., Kiebler, M., Greenberg, M. E. (2006). A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature*. doi.org/10.1038/nature04367
- Shimizu, T., Minami, C., Mitani, A. (2018). Effect of electrical stimulation of the

- infralimbic and prelimbic cortices on anxiolytic-like behavior of rats during the elevated plus-maze test , with particular reference to multiunit recording of the behavior-associated neural activity. *Behavioural Brain Research*, 353(April), 168–175. doi.org/10.1016/j.bbr.2018.07.005
- Song, X. C., Moyer, J. R. (2018). Layer- and subregion-specific differences in the neurophysiological properties of rat medial prefrontal cortex pyramidal neurons, 177–191. doi.org/10.1152/jn.00146.2017
- Sotres-Bayon, F., Quirk, G. J. (2010). Prefrontal control of fear: More than just extinction. *Current Opinion in Neurobiology*, 20(2), 231–235. doi.org/10.1016/j.conb.2010.02.005
- Squire, L R, Zola-Morgan, S. (1988). Memory: brain systems and behavior. *Trends Neurosci*, 11(4), 170–175.
- Squire, L. R., Alvarez, P. (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Current Opinion in Neurobiology*. doi.org/10.1016/0959-4388(95)80023-9
- Steiner, P., Higley, M. J., Xu, W., Czervionke, B. L., Malenka, R. C., Sabatini, B. L. (2008). Destabilization of the Postsynaptic Density by PSD-95 Serine 73 Phosphorylation Inhibits Spine Growth and Synaptic Plasticity. *Neuron*. doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.014
- Stork, O., Welzl, H. (1999). Memory formation and the regulation of gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences*. doi.org/10.1007/s000180050316
- Sutton, M. A., Schuman, E. M. (2006). Dendritic Protein Synthesis, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cell*. doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.014
- Tang, J., Ko, S., Ding, H.-K., Qiu, C.-S., Calejesan, A. a, Zhuo, M. (2005). Pavlovian fear memory induced by activation in the anterior cingulate cortex. *Molecular pain*, 1, 6. doi.org/10.1186/1744-8069-1-6
- Tang, L., Hung, C. P., Schuman, E. M. (1998). A role for the cadherin family of cell adhesion molecules in hippocampal long-term potentiation. *Neuron*. doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80497-3
- Tashiro, A., Yuste, R. (2003). Structure and molecular organization of dendritic spines. *Histology and histopathology*, 18(2), 617–634.



- Terry-Lorenzo, R. T., Carmody, L. C., Voltz, J. W., Connor, J. H., Li, S., Donelson Smith, F., ... Shenolikar, S. (2002). The neuronal actin-binding proteins, neurabin I and neurabin II, recruit specific isoforms of protein phosphatase-1 catalytic subunits. *Journal of Biological Chemistry*. doi.org/10.1074/jbc.M203365200
- Tulving, E. (1987). Multiple memory systems and consciousness. *Human neurobiology*. doi.org/10.1002/pmic.201700321
- Tynan, R. J., Beynon, S. B., Hinwood, M., Johnson, S. J., Nilsson, M., Woods, J. J., Walker, F. R. (2013). Chronic stress-induced disruption of the astrocyte network is driven by structural atrophy and not loss of astrocytes. *Acta Neuropathologica*. doi.org/10.1007/s00401-013-1102-0
- Vertes, R. P. (2004). Differential Projections of the Infralimbic and Prelimbic Cortex in the Rat. *Synapse*. doi.org/10.1002/syn.10279
- Vetere, G., Restivo, L., Cole, C. J., Ross, P. J., Ammassari-Teule, M., Josselyn, S. A., Frankland, P. W. (2011). Spine growth in the anterior cingulate cortex is necessary for the consolidation of contextual fear memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(20), 8456–8460. doi.org/10.1073/pnas.1016275108
- Vidal-Gonzalez, I., Vidal-Gonzalez, B., Rauch, S. L., Quirk, G. J. (2006). Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learning Memory*, 13(6), 728–733. doi.org/10.1101/lm.306106
- Wallis, J. D. (2012). Cross-species studies of orbitofrontal cortex and value-based decision-making. *Nature Neuroscience*. doi.org/10.1038/nn.2956
- Wang, H., Hu, Y., Tsien, J. Z. (2006). Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Progress in Neurobiology*, 79(3), 123–135. doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.06.004
- Wartman, B. C., Holahan, M. R. (2014). The impact of multiple memory formation on dendritic complexity in the hippocampus and anterior cingulate cortex assessed at recent and remote time points. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00128
- Weele, C. M. Vander, Siciliano, C. A., Tye, K. M. (2018). Dopamine tunes prefrontal outputs to orchestrate aversive processing. *Brain Research*,

doi.org/10.1016/j.brainres.2018.11.044

- Wellman, C. L. (2001). Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *Journal of Neurobiology*, *49*(3), 245–253. doi.org/10.1002/neu.1079
- Willoughby, J. O., Mackenzie, L., Medvedev, A., Hiscock, J. J. (1997). Fos induction following systemic kainic acid: Early expression in hippocampus and later widespread expression correlated with seizure. *Neuroscience*. doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00462-9
- Wolf, M., Burgess, S., Misra, U. K., Sahyoun, N. (1986). Postsynaptic densities contain a subtype of protein kinase C. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi.org/10.1016/0006-291X(86)90787-4
- Xu, T., Yu, X., Perlik, A. J., Tobin, W. F., Zweig, J. A., Tennant, K., ... Zuo, Y. (2009). Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature*, *462*(7275), 915–919. doi.org/10.1038/nature08389
- Yang, F. C., Liang, K. C. (2014). Interactions of the dorsal hippocampus, medial prefrontal cortex and nucleus accumbens in formation of fear memory: Difference in inhibitory avoidance learning and contextual fear conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory*, *112*, 186–194. doi.org/10.1016/j.nlm.2013.07.017
- Young, A. M. (2010). State-Dependent Learning and Memory. En I. P. Stolerman L. H. Price (Eds.), *Encyclopedia of Psychopharmacology* (pp. 1–9). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi.org/10.1007/978-3-642-27772-6\_7024-1
- Yuste, R. (2015). From the neuron doctrine to neural networks. *Nature Reviews Neuroscience*, *16*(8), 487–497. doi.org/10.1038/nrn3962
- Zarrindast, M. R., Rezayof, A. (2004). Morphine state-dependent learning: Sensitization and interactions with dopamine receptors. *European Journal of Pharmacology*, *497*(2), 197–204. doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.06.041
- Zhang, Y, Fukushima, H., Kida, S. (2011). Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Mol Brain*, *4*, 4. doi.org/10.1186/1756-6606-4-4
- Zhang, Y., Fukushima, H., Kida, S. (2011). Induction and requirement of gene expression

in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Molecular brain*, 4, 4. doi.org/10.1186/1756-6606-4-4

Zhuravin, I., Bures, J. (1991). Extent of the tetrodotoxin induced blockade examined by pupillary paralysis elicited by intracerebral injection of the drug. *Experimental brain research*, 687–690.

---

## 10. PUBLICACIÓN CIENTÍFICA

---



# Differential Effects of Inactivation of Discrete Regions of Medial Prefrontal Cortex on Memory Consolidation of Moderate and Intense Inhibitory Avoidance Training

It has been found that varying the amount of training has important consequences on memory processes. When learning is brought about through intense training, memory formation is guarded against a host of amnesic treatments (For a review see Prado-Alcalá et al., 2012).<sup>1</sup> This protective effect has been consistently found after training of instrumental tasks, where a reinforcer is available after performance of a specific response (Prado-Alcalá and Cobos-Zapain, 1977, 1979; Prado-Alcalá et al., 1980). This effect has also been described in tasks that entail both classical and instrumental components such as active and inhibitory avoidance (IA). In these cases, the animal is exposed to a conditioned stimulus and then to an unconditioned aversive stimulus, regardless of its behavior. However, after training, the animals can avoid the aversive stimulation by performing an instrumental response before the onset of the stimulus. Thus, interfering with serotonergic activity impairs both acquisition and retention of active avoidance after training with relatively low foot-shock intensities, but not when training with higher foot-shock intensities (Galindo et al., 2008). Similarly, electrolytic lesions of lateral and basal nuclei of the amygdala impaired acquisition of a Sidman avoidance task but enhanced training protected performance of this task (Lazaro-Muñoz et al., 2010).

Systemic amnesic treatments also impede memory consolidation of IA but, again, no such deficit is produced after intense training (Durán-Arévalo et al., 1990; Cruz-Morales et al., 1992; Solana-Figueroa et al., 2002; Díaz-Trujillo et al., 2009). The same is true when treatments are administered to the striatum (Giordano and Prado-Alcalá, 1986; Pérez-Ruiz and Prado-Alcalá, 1989; Salado-Castillo et al., 2011), hippocampus (Quiroz et al., 2003; Garín-Aguilar et al., 2014), amygdala (Parent et al., 1992, 1994; Thatcher and Kimble, 1966), and *substantia nigra* (Cobos-Zapain et al., 1996).

The medial prefrontal cortex (mPFC), which includes the anterior cingulate (ACC), prelimbic (PL), and infralimbic (IL) regions (Heidbreder and Groenewegen, 2003; Vertes, 2004, 2006), has received a good deal of attention in relation to its involvement in classical fear conditioning (Mello e Souza et al., 1999; Yang and Liang, 2014; Zhang et al., 2011), and it has been suggested that these regions participate differentially across the various stages of memory of fear conditioning (Giustino and Maren, 2015). Thus, ACC has been associated with acquisition (Sacchetti et al., 2003; Tang et al., 2005; Bissière et al., 2008), PL with expression (retrieval) (Blum et al., 2006; Vidal-Gonzalez et al., 2006; Corcoran and Quirk, 2007) and IL with the process of extinction (Quirk and Mueller, 2008) and control of fear (Sotres-Bayon and Quirk, 2010). However, literature on the participation of the mPFC in memory processes related to instrumental performance is scarce. It has been reported that electrolytic lesions of IL, but not of PL, produce a deficit of the instrumental component involved in retention of step-down IA (Jinks and McGregor, 1997).

<sup>1</sup>Intense or enhanced training refers to conditions where a high number of trials or training sessions are given, and, in the case of aversive conditioning, to training motivated by relatively high intensities of foot-shock. In both instances, intense training yields stronger resistance to extinction than moderate and low levels of training.

To the best of our knowledge, the protective effect on learning and memory of enhanced training has not been studied in relation to selective inactivation of neural activity of ACC, PL, and IL. For this reason, and because of the differential functional attributes that have been described within the mPFC, we deemed it important to explore the effects of temporary inactivation of the three regions of mPFC on memory consolidation of moderate and intense IA training. We hypothesized that transient inactivation of AC, PL, and IL would produce differential effects on memory consolidation of IA, and that intense training would offset potential deficiencies produced by such inactivation.

## MATERIALS AND METHODS

This section describes the procedures common to all the experiments of this study. Other procedures characteristic of particular experiments will be described where appropriate.

### Subjects

Male Wistar rats (300–350 g) from the breeding colony at the Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, were individually housed with water and food *ad libitum* and maintained in a room with a 12 h/12 h light-dark cycle (lights on at 7:00 h). The temperature of the room was  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . The rats were randomly assigned to each group, and training and testing were performed during the light phase of the cycle, between 8:00 am and 12:00 pm. The experimental protocol was approved by the Animal Ethics Committee of Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México and complied with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011).

### Surgery

Rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, ip), injected with atropine (1 mg/kg, ip) to prevent obstruction of the respiratory tract, and their heads were positioned on a stereotaxic frame (Stoelting Co., United States). The tips of the bilateral stainless steel guide cannula (length: 8 mm for ACC and 10 mm for PL and IL; 23-gauge) were aimed 1 mm above ACC (+2.8 mm from bregma;  $\pm 0.4$  mm from midline;  $-1.4$  mm below skull), PL (+3.0 mm from bregma;  $\pm 0.7$  mm from midline;  $-3.2$  mm below skull), or IL (+3.0 mm from bregma;  $\pm 0.6$  mm from midline;  $-4.2$  mm below skull surface) (Paxinos and Watson, 2007). The cannulae were affixed to the skull using one jewelry screw and dental cement. Stylets (8 mm-long for ACC, and 10 mm-long for PL and IL) were inserted into each cannula to maintain patency and were removed, and placed back, during the manipulation sessions and for the administration of treatments. After surgery, the animals received 1.0 ml of 0.9% saline solution, ip, and were kept in an incubator until fully recovered from anesthesia. Following surgery, rats were allowed to recover for 7 days before initiation of training. During this period, each animal was handled by the experimenter, gently touching and holding the rat for approximately 5 min on three consecutive days.

## Apparatus

The rats were trained in an IA apparatus consisting of two compartments separated by a sliding door. The safe compartment (30 cm × 30 cm × 30 cm) had a lid and walls made of transparent red-colored acrylic, with a floor made of stainless steel bars (6 mm in diameter, 9 mm apart). This compartment was illuminated by a 10-W light bulb located in the center of its lid. The other, non-illuminated shock compartment (30 cm long) had front and back walls and floor made of stainless steel plates with side walls and lid constructed of transparent red-colored acrylic. The walls and floor were shaped like a trough, 20 cm wide at the top and 8 cm wide at the bottom. In the middle of the floor, a 1.5 cm slot separated the two stainless steel plates that make up the walls and floor. Upon entering the non-illuminated compartment, the rats were in contact with both plates through which a foot-shock could be delivered. A square-pulse stimulator (Grass model S-48), in series with a constant current unit (Grass model CCU-1), generated the foot-shock. Shock delivery and measurement of latencies to cross from one compartment to the other one were accomplished by use of automated equipment. Both compartments were wiped with 10% alcohol before and after each rat occupied it. The apparatus was located inside a dark, sound-proof room provided with background masking noise.

## Training and Testing of Inhibitory Avoidance

On the day of training, each rat was placed inside the safe compartment, and 10 s later the door between the two compartments was opened. The latency to cross from the safe compartment to the shock compartment is referred to as the training latency. Once the animals crossed to this compartment the door was closed and foot-shock of 1.0 or 3.0 mA was delivered (a train of 50 ms square pulses at 10 Hz). Five seconds later the door was reopened, allowing the rat to escape to the safe compartment, and then the stimulator was turned-off; this latency is referred to as the escape latency. After 30 s in the safe compartment, the rat was placed back in its home cage. Retention of the task was measured 48 h after training; in some cases retention was recorded both at 30 min (during encoding acquisition) and 48 h after training in the same animals. In these retention sessions, the same procedure as in training was followed except that the foot-shock was omitted. If the rat did not cross within 600 s, the session ended and a score of 600 was assigned.

## Treatments

Tetrodotoxin (TTX) was used to inactivate the target areas; it reversibly blocks voltage-dependent sodium channels, thus preventing the generation and propagation of action potentials (Fozzard and Lipkind, 2010). The simultaneous bilateral infusions of TTX (Sigma, C11H17N3O8, T8024; 0.3 µg/hemisphere, dissolved in 0.3 µL of isotonic saline) or an equal volume of the vehicle (VEH) into ACC, PL, or IL were made 25 min before training. In additional groups of rats, the same dose of TTX or VEH was administered into IL immediately after training. The infusion rate was 0.3 µL/min and was

controlled by an automated microinfusion pump (WPI, model 220i). At the end of the infusion, the injection needles, which protruded 1.0 mm beyond the tip of the cannulae, remained inside the guide cannulae for 60 s to minimize backflow. The injection procedure was carried out in a different room from that in which training and testing took place.

## Histology

The rats were anesthetized with sodium pentobarbital (125 mg/kg) and were perfused intracardially with 0.9% saline solution followed by 4% formalin. The brains were removed and immersed in a 4% formaldehyde solution for at least 5 days. Sections were cut (50 µm thick) on a cryostat and stained with cresyl violet. The sections were examined under a light microscope, and the location of the injection needle tips was determined. The data of rats with cannula tips outside the target areas were not included in the statistical analyses. Figures 1C, 2F, and 3F show examples of cannula tip sites in ACC, PL, and IL, respectively.

## c-FOS Immunohistochemistry

To evaluate the blocking effect of TTX on neural activity in each of the three regions of mPFC that were studied, we used immunohistochemistry to detect c-Fos, as this protein is commonly used as a marker of such activity (Sagar et al., 1988; Herrera and Robertson, 1996; Willoughby et al., 1997). To this end, for each region a group of rats was trained with 1.0 or 3.0 mA, and half the group was treated with TTX or VEH, as described above, but retention of the task was not measured. A group of naïve animals ( $n = 6$ ), used to obtain the basal number of c-Fos-positive cells, was kept under identical living conditions as those of the rest of the groups, but they never left the bioterium, except for sacrificing. One hour after training, the animals were anesthetized with sodium pentobarbital (125 mg/kg) and transcardially perfused with physiological saline followed by 4% PFA (pH 9.5, 10°C). The brains were removed and stored in the fixing solution for 4 h, then in 15% sucrose overnight followed by 30% sucrose; solutions were kept at 4°C. Three days later, four serial coronal sections (30 µm in thickness) were obtained at -20°C from ACC, PL, and IL and kept in a cryoprotectant solution (30% ethylene glycol and 20% glycerol in 0.05 M sodium phosphate buffer) at -20°C until histochemical processing. The brain slices were successively incubated in PB 0.1 M for 20 min, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.03% for 10 min, NaBH<sub>4</sub> 1% for 6 min, and NGS 3% for 30 min. They were then incubated for 48 h at 4°C in a c-Fos polyclonal antibody (Anti-c-Fos rabbit, 1:5000, Abcam, Cambridge, MA, United States), followed by 1 h incubation in goat anti-rabbit biotinylated secondary antibody (BA-1000, 1:500; Vector Laboratories, Burlingame, CA, United States), 1 h in a Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, United States), and 10 min in DAB solution (0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NAS). The brain slices were placed on glass slides, dehydrated progressively with alcohol followed by the clearing agent xylene, and then covered with Entellan®.

Digital images were obtained with a Leica AF6000 Microsystem (Leica, Germany) using a 10× objective. c-Fos-positive cell count was automatically performed with the

“cell counter” plug-in using the ImageJ software (NIH)<sup>2</sup>. Three counting boxes (100  $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ ) were positioned horizontally and centered 100  $\mu\text{m}$  below the bilateral injection needle tracks; thus, six images per animal were analyzed. Because ACC, PL, and IL are next to each other along a dorsal-ventral dimension, it was important to assess the possibility that TTX might have had an effect due to diffusion from the target region to its neighboring ventral region. To this end, a counting box was positioned at 600  $\mu\text{m}$  below each injection needle-tip track of the PL group. The expression level of c-Fos in each brain region for each group was expressed as the ratio of averaged count of c-Fos-positive cells of each rat for each group divided by the average count of c-Fos-positive cells for the corresponding naïve group.

### Statistical Analyses

Because the measurement of retention of the IA task was truncated at 600 s, non-parametric statistics were used in analyzing the behavioral results. Comparisons of training, escape, and retention latencies between TTX and VEH groups in each region of mPFC were carried out using the Mann–Whitney *U* test. Likewise, c-Fos-positive cell counts in TTX and VEH groups in each region of mPFC were compared with the Mann–Whitney *U* test.

## RESULTS

### Anterior Cingulate Cortex

#### Training and Escape Latencies

The Mann–Whitney *U* test showed that there were no significant differences in latency scores between the TTX and VEH groups, regardless of foot-shock intensities that were used during training. Median training latencies of the VEH and TTX groups that had been trained with 1.0 mA were 15.85 and 30.35 s ( $p = 0.15$ ), and for those trained with 3.0 mA were 19.70 and 31.05 s ( $p = 1.0$ ), respectively (data not shown). Similarly, there were no significant differences in escape latencies between the TTX and VEH groups, regardless of the foot-shock intensities. Median escape latencies displayed by the 1.0 mA groups were 4.10 and 2.30 s ( $p = 0.57$ ), respectively. In the VEH and TTX groups trained with 3.0 mA, escape latencies were 1.35 and 1.90 s ( $p = 0.68$ ), respectively (data not shown).

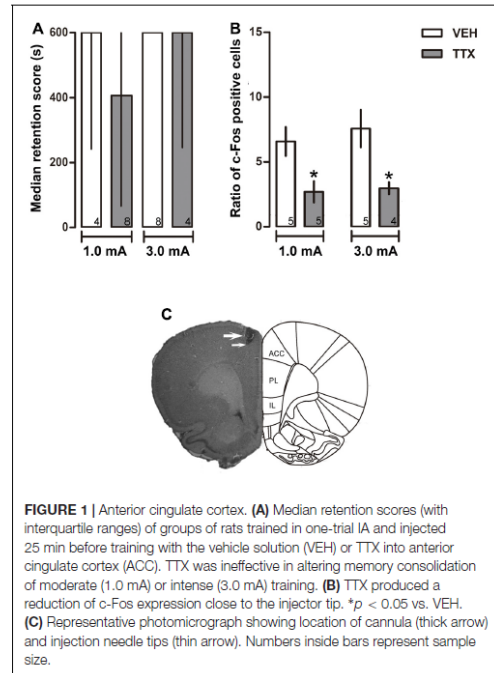
#### Long-Term Memory

No significant differences between the VEH and TTX groups were evident in retention latencies measured 48 h after training, regardless of the intensity of foot-shock used for training (1.0 mA,  $p = 0.46$  and 3.0 mA,  $p = 0.81$ ) (Figure 1A).

#### c-Fos Immunohistochemistry

Tetrodotoxin administration into ACC induced a significant reduction of c-Fos expression relative to VEH in the groups that had been trained with 1.0 and 3.0 mA ( $p < 0.05$  for each intensity) (Figure 1B). Figure 1C is a representative photomicrograph showing placement of a cannula in ACC.

<sup>2</sup><http://rsb.info.nih.gov/ij/>



**FIGURE 1 |** Anterior cingulate cortex. **(A)** Median retention scores (with interquartile ranges) of groups of rats trained in one-trial IA and injected 25 min before training with the vehicle solution (VEH) or TTX into anterior cingulate cortex (ACC). TTX was ineffective in altering memory consolidation of moderate (1.0 mA) or intense (3.0 mA) training. **(B)** TTX produced a reduction of c-Fos expression close to the injector tip. \* $p < 0.05$  vs. VEH. **(C)** Representative photomicrograph showing location of cannula (thick arrow) and injection needle tips (thin arrow). Numbers inside bars represent sample size.

### Prelimbic Cortex

#### Training and Escape Latencies

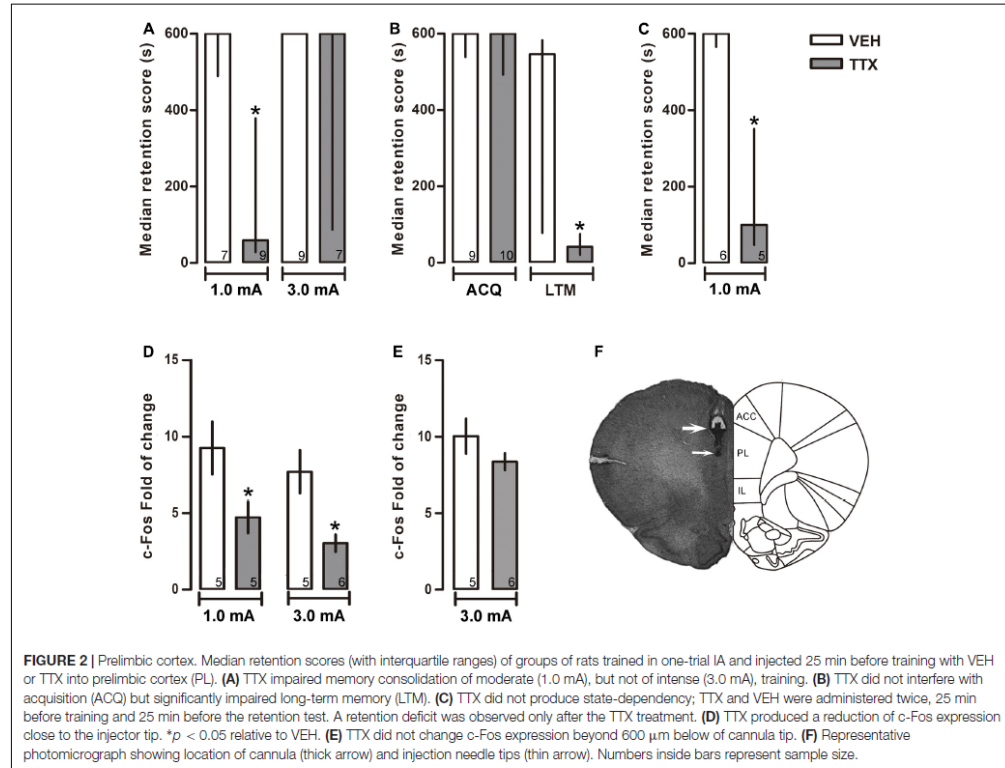
The Mann–Whitney *U* test showed that there were no significant differences in training latencies displayed by the 1.0 mA TTX (40.20 s) and VEH (26.20 s) groups ( $p = 0.18$ ), as well as in the 3.0 mA TTX (28.80 s) and VEH (26.40 s) groups ( $p = 1.0$ ). Similarly, there were no significant differences in escape latencies between the TTX and VEH groups, regardless of the foot-shock intensities. Median escape latencies displayed by the 1.0 mA groups were 1.80 and 1.40 s, respectively ( $p = 0.49$ ), and median escape latencies of the TTX and VEH groups trained with 3.0 mA were 0.80 and 0.60 s, respectively ( $p = 0.27$ ) (data not shown).

#### Long-Term Memory

The TTX group trained with 1.0 mA displayed a significantly lower score than its VEH control group ( $p < 0.05$ ) during the 48-h retention test. In contrast, no differences were found when comparing the TTX and VEH groups trained with 3.0 mA ( $p = 0.13$ ) (Figure 2A).

#### Acquisition

To evaluate whether the amnesic effect of pre-training infusion of TTX in the 1.0 mA PL group was due to interference with learning of the IA task rather than with consolidation, TTX or VEH was administered 25 min before training with 1.0 mA, and



**FIGURE 2 |** Prelimbic cortex. Median retention scores (with interquartile ranges) of groups of rats trained in one-trial IA and injected 25 min before training with VEH or TTX into prefrontal cortex (PL). **(A)** TTX impaired memory consolidation of moderate (1.0 mA), but not of intense (3.0 mA), training. **(B)** TTX did not interfere with acquisition (ACQ) but significantly impaired long-term memory (LTM). **(C)** TTX did not produce state-dependency; TTX and VEH were administered twice, 25 min before training and 25 min before the retention test. A retention deficit was observed only after the TTX treatment. **(D)** TTX produced a reduction of c-Fos expression close to the injector tip. \* $p < 0.05$  relative to VEH. **(E)** TTX did not change c-Fos expression beyond 600  $\mu\text{m}$  below of cannula tip. **(F)** Representative photomicrograph showing location of cannula (thick arrow) and injection needle tips (thin arrow). Numbers inside bars represent sample size.

retention was measured twice: at 30 min and at 48 h after training. The results showed no significant differences between the TTX and VEH groups on the retention test run 30 min after training ( $p = 0.95$ ) while, again, a reliable deficit was shown by the TTX group in the 48-h test ( $p < 0.05$ ) (Figure 2B).

#### State Dependency

Because the TTX was administered 25 min before training, and retention was measured 48 h later in a non-drug state, it was feasible that the amnesia thus produced could have been due to a state-dependent effect. To rule out this possibility, two groups of rats were treated twice, with either TTX or VEH, 25 min before training and 25 min before retention testing. In comparison to the VEH group, the TTX group showed reliable amnesia ( $p < 0.05$ ) (Figure 2C).

#### c-Fos Immunohistochemistry

Tetradotoxin administration into PL induced a significant decrement in c-Fos expression relative to VEH in the groups that had been trained with 1.0 or 3.0 mA ( $p < 0.05$ , in each case) (Figure 2D).

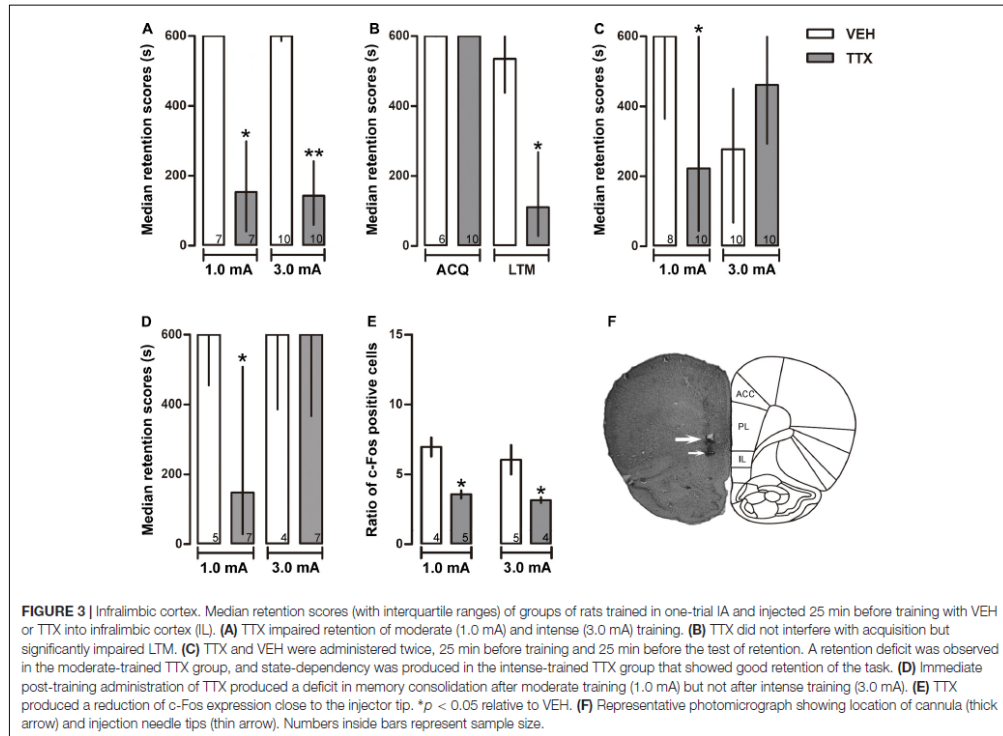
As mentioned in Section “Materials and Methods,” c-Fos expression was also measured within a  $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$  counting box located 600  $\mu\text{m}$  below the PL injector-tip tracks. We found that TTX did not interfere with c-Fos expression, as there were no significant differences between the VEH and TTX groups,  $p = 0.73$  (Figure 2E). This finding demonstrates that the deficit in memory consolidation seen in the animals that had been trained with 1.0 mA was due to inactivation of PL and not to diffusion of the drug into the more ventrally located IL.

Figure 2F is a representative photomicrograph showing placement of cannula tip in PL.

#### Infralimbic Cortex

##### Training and Escape Latencies

The Mann-Whitney  $U$  test showed that there were no significant differences in training latencies between the TTX and VEH groups, regardless of the foot-shock intensities. Median training latencies displayed by the 1.0 mA groups were 33.60 and 25.20 s ( $p = 0.80$ ), respectively. In the VEH and TTX groups trained with 3.0 mA, training latencies were 24.20 and 23.50 s ( $p = 0.97$ ), respectively (data not shown). Similarly, there were no significant



**FIGURE 3** | Infralimbic cortex. Median retention scores (with interquartile ranges) of groups of rats trained in one-trial IA and injected 25 min before training with VEH or TTX into infralimbic cortex (IL). **(A)** TTX impaired retention of moderate (1.0 mA) and intense (3.0 mA) training. **(B)** TTX did not interfere with acquisition but significantly impaired LTM. **(C)** TTX and VEH were administered twice, 25 min before training and 25 min before the test of retention. A retention deficit was observed in the moderate-trained TTX group, and state-dependency was produced in the intense-trained TTX group that showed good retention of the task. **(D)** Immediate post-training administration of TTX produced a deficit in memory consolidation after moderate training (1.0 mA) but not after intense training (3.0 mA). **(E)** TTX produced a reduction of c-Fos expression close to the injector tip. \* $p < 0.05$  relative to VEH. **(F)** Representative photomicrograph showing location of cannula (thick arrow) and injection needle tips (thin arrow). Numbers inside bars represent sample size.

differences in escape latencies between the TTX and VEH groups, regardless of the foot-shock intensities. Median escape latencies displayed by the 1.0 mA groups were 1.70 and 1.20 s ( $p = 0.28$ ), respectively. In the VEH and TTX groups trained with 3.0 mA, escape latencies were 2.70 and 2.30 s ( $p = 0.65$ ), respectively (data not shown).

As in the case of PL, TTX infusion into IL produced a significant retention deficit during the 48-h post-training session in the group that had been trained with 1.0 mA ( $p < 0.01$  vs. VEH). Unexpectedly, TTX produced the same amnesic effect in the 3.0 mA group ( $p < 0.005$  vs. VEH) (Figure 3A).

#### Acquisition

To evaluate whether the amnesic effect of pre-training infusion of TTX had been due to interference with learning rather than with consolidation, two groups of rats were trained with the low foot-shock (1.0 mA) and subjected to TTX or VEH injections into the IL 25 min before training. Retention was measured twice: at 30 min and at 48 h after training. The results showed no significant differences between the TTX and VEH groups during the retention test run 30 min after training ( $p = 0.85$ ), while a reliable deficit was shown by the TTX group in the 48-h test ( $p < 0.02$ ) (Figure 3B).

#### State Dependency

To determine whether the amnesic effect of pre-training TTX seen in the 1.0 and 3.0 mA IL groups during the 48-h retention test (Figure 3A) might have been due to state-dependency, two groups of rats were trained with 1.0 mA and another two groups were trained with 3.0 mA. Half of each group was treated twice with TTX and the other half with VEH, also twice, 25 min before training and 25 min before retention testing. TTX produced a significantly lower retention score relative to its VEH control group after training with 1.0 mA group ( $p < 0.05$ ). In contrast, state-dependency was produced when 3.0 mA was used for training, as there were no reliable differences in retention scores between the TTX and VEH groups that had been trained with 3.0 mA ( $p = 0.11$ ) (Figure 3C).

#### Post-training TTX Administration into IL

The results of the preceding experiment showed that pre-training TTX infusion into the IL produced a clear state-dependent effect when training was conducted with 3.0 mA, but not when 1.0 mA was used. Thus, the apparent amnesic effect produced after a single pre-training TTX infusion (Figure 3A) could be explained by the interaction of the high foot-shock and the differential pharmacological state of the IL cortex during training (drugged



state) and retention testing (non-drugged state). This outcome did not allow us to answer the question of whether IL has a role in memory consolidation when a high aversive stimulation is used to produce learning. To shed light into this matter, we decided to study the effects of IL inactivation with TTX induced after training, thus avoiding the confounding effect of state-dependency. To this end, two groups of rats were trained with 1.0 mA and another two groups were trained with 3.0 mA. Half of each group was treated with TTX and the other half with VEH. The infusions were made immediately after training. A significant retention deficit was observed in the TTX group that had been trained with 1.0 mA ( $p < 0.03$  vs. VEH), whereas no significant differences between the TTX and VEH groups trained with 3.0 mA were found ( $p = 0.11$ ) (Figure 3D).

#### c-FOS Immunohistochemistry

The infusion of TTX into the IL induced a significant decrement in c-Fos expression relative to VEH in the groups that had been trained with 1.0 or 3.0 mA ( $p < 0.05$  for each comparison) (Figure 3E).

## DISCUSSION

The main findings of this study, where TTX was administered before training, were that regardless of the intensity of training, transient inactivation of ACC did not disrupt memory consolidation of the IA task. In contrast, in PL and IL TTX produced a highly significant deficit of consolidation when the moderate foot-shock was used in training. Interestingly, the retention deficit was still evident after training with the high foot-shock when IL had been inactivated, due to state-dependency, but retention was not diminished in the PL group (Figures 1A, 2A, 3A). When TTX was administered immediately post-training into IL, it interfered with consolidation only when the moderate foot-shock was used. We suggest that these differential effects are dependent on the dissimilar connectivity of the three regions that were studied. They receive strong connections from the same thalamic regions; PL and IL receive afferents from the basolateral and basomedial nuclei of the amygdala; and PL is more densely connected to limbic cortical areas than ACC and IL (Hoover and Vertes, 2007). Further research is needed to study the contribution of these different anatomical interactions in memory consolidation of IA.

The histochemical results showed that administration of TTX in each of those cortical regions produced reliable neuronal inactivation, as evidenced by the diminished detection of c-Fos near the injector tips. Because there were no significant differences in training and escape latencies between the TTX- and VEH-treated animals, irrespective of the microinjected region or the intensity of the foot-shock used for training, the impaired retention that was found in the PL and IL groups cannot be explained by any potential deficiency of the motor or perceptual activities necessary to perform the IA task. In other words, the treated animals could cross from the safe compartment to the shock compartment, and escape from the foot-shock just

as efficiently as the VEH-treated animals. What follows is a discussion focusing on relevant studies on IA.

### Anterior Cingulate Cortex

Inactivation of ACC did not interfere with memory consolidation of IA, as indicated by the high retention scores of animals trained with 1.0 and 3.0 mA. This agrees with the report of Mello e Souza et al. (1999) that intra-ACC administration of muscimol and AP5 did not impede the formation of long-term memory of this task. Our result is also congruent with the lack of impairment of memory consolidation of IA found after pre-training radiofrequency lesion (Chai et al., 2010) of ACC. Taken together, these data suggest that this region is not involved in neural activity encoding needed for memory consolidation of the CS-UCS association during training of the IA task. This interpretation must be taken cautiously, because other lines of research suggest that ACC is involved in memory consolidation of IA. Thus, infusion of the cholinergic agonist oxotremorine into ACC immediately after IA training improved memory (Malin and McGaugh, 2006) and, consistent with this finding, it was shown that pre-training and post-training infusion of scopolamine, a cholinergic antagonist, impaired memory consolidation of this task (Riekkinen et al., 1995). Furthermore, administration of a protein synthesis inhibitor into ACC or mPFC (which included PL and IL) produced a significant retention deficit of IA (Zhang et al., 2011). New studies are needed to comprehend these dissimilar results.

### Prelimbic Cortex

The findings that inactivation of PL produced a marked deficiency of retention when the low intensity foot-shock was used for training, and that it did not impede performance when the high foot-shock was used (Figure 2A) fit well with previous results where interference with neural activity of striatum (Giordano and Prado-Alcalá, 1986; Pérez-Ruiz and Prado-Alcalá, 1989), hippocampus (Quiroz et al., 2003; Garín-Aguilar et al., 2014), amygdala (Parent et al., 1992, 1994), and substantia nigra (Cobos-Zapain et al., 1996; Salado-Castillo et al., 2011) disrupted memory consolidation when IA training took place with a low intensity of aversive stimulation, but not when stimulation of relatively high intensity was used.

That the impairment in retention shown by the TTX group that had been trained with the low foot-shock was due to interference with memory consolidation, and not to a deficiency in learning, was demonstrated by the optimal performance shown by the group of animals that was tested 30 min after the administration of the drug. A deficit in consolidation became evident when this group was given a second retention test 48 h later (Figure 2B).

Because training took place under the influence of TTX, and retention of the task was measured when the animals were in a non-drugged condition, the possibility existed that the retention deficit observed in the low foot-shock group was due to a phenomenon of state-dependency and not to disturbance of memory consolidation. This possibility was

discarded because a group of rats that was trained and tested under the same pharmacological condition exhibited a deficient retention (Figure 2C).

The retention deficit observed in the present study gives support to the findings of Santos-Anderson and Routtenberg (1976) and of Jinks and McGregor (1997). The former authors showed that low-level electrical stimulation of the ventral aspect of the mPFC interfered with memory consolidation of IA, and the latter found that electrolytic lesions of PL produced a deficit in IA. Together, these findings indicate that PL has similar functions to those of the striatum, hippocampus, amygdala, and substantia nigra regarding memory consolidation of IA, i.e., these structures are necessary for memory consolidation under conditions of moderate training because interference with neural activity of any one of them impedes the formation of long-term memory. On the other hand, consolidation takes place after intense training despite this interference. It has been hypothesized that these structures are not critical for mediating associative processes derived from intense training, which produces plastic changes allowing for the recruitment of other structures.

### Infralimbic Cortex

The study of IL yielded a complex set of data. In agreement with previous results, where lesions of IL produced a significant retention deficit of IA (Jinks and McGregor, 1997), we found that infusion of TTX into IL had the same detrimental effect when the low foot-shock was used for training. Contrary to our expectations, intense training did not protect memory consolidation against the inactivation produced by the TTX (Figure 3A). The memory test that was made 30 min post-training to the group of animals that were treated with TTX into IL yielded top retention scores, while a reliable deficit was observed 48 h later in this same group. As in the case of PL inactivation, these results indicate that learning took place and that the impaired retention was due to a failure in memory consolidation (Figure 3B).

When TTX was infused into IL twice (both before training and before the 48-h retention test) a retention deficit was produced in the low foot-shock group but, unexpectedly, not in the high foot-shock group (Figure 3C). To the best of our knowledge, this is the first time that a state-dependent effect has been found in mPFC. Thus, the question of whether IL is involved in memory consolidation of intense training could not be answered with this experimental design. This problem was solved by administering the treatments immediately after training with the low and the

high intensity of foot-shock, thus avoiding the induction of state-dependency. This manipulation confirmed that inactivation of IL impedes memory consolidation when IA training is carried out with an aversive stimulus of low intensity, and it revealed that, indeed, intense training protects against the amnesic effect of inactivation produced by the TTX (Figure 3D).

### CONCLUSION

The data obtained in this experimental series indicate that (a) memory consolidation of IA is not dependent on neural activity of the ACC; (b) normal activity of PL is essential for memory consolidation of moderate IA training, but not for acquisition or for consolidation of intense training; (c) normal activity of IL is also essential for memory consolidation of moderate IA training but not for acquisition or for consolidation of intense training. Moreover, the combined effect of TTX and intense training induces state-dependency.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Designed the experiments: MT-G, AM, and RP-A. Performed the behavioral and histological experiments: MT-G and AM. Analyzed the data: MT-G and AM. Wrote and provided comments and discussion for the manuscript: MT-G, AM, GQ, and RP-A.

### FUNDING

This research was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM; IN201415) and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; 237570). MT-G is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM and received fellowship 245656 from CONACYT.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Bertha Islas, Norma Serafin, Omar González, Leonor Casanova, Martín García, and Sandra Hernández for their excellent technical and administrative assistance. We also wish to thank Jessica González Norris for editorial comments.

### REFERENCES

- Bissière, S., Plachta, N., Hoyer, D., McAllister, K. H., Olpe, H. R., Grace, A. A., et al. (2008). The rostral anterior cingulate cortex modulates the efficiency of amygdala-dependent fear learning. *Biol. Psychiatry* 63, 821–831. doi: 10.1016/j.biopsych.2007.10.022
- Blum, S., Hebert, A. E., and Dash, P. K. (2006). A role for the prefrontal cortex in recall of recent and remote memories. *Neuroreport* 17, 341–344. doi: 10.1097/01.wnr.0000201509.53750.bc
- Chai, S. C., Kung, J. C., and Shyu, B. C. (2010). Roles of the anterior cingulate cortex and medial thalamus in short-term and long-term aversive information processing. *Mol. Pain* 6:42. doi: 10.1186/1744-8069-6-42
- Cobos-Zapía, G. G., Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavez, M., Quirarte, G. L., Roldán-Roldán, G., and Prado-Alcalá, R. A. (1996). High level of footshock during inhibitory avoidance training prevents amnesia induced by intranigral injection of GABA antagonists. *Neurobiol. Learn. Mem.* 65, 202–206. doi: 10.1006/nlme.1996.0024
- Corcoran, K. A., and Quirk, G. J. (2007). Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *J. Neurosci.* 27, 840–844. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5327-06.2007
- Cruz-Morales, S. E., Durán-Arevalo, M., Díaz del Guante, M. A., Quirarte, G. L., and Prado Alcalá, R. A. (1992). A threshold for the protective effect of over-reinforced passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Behav. Neural Biol.* 57, 256–259. doi: 10.1016/0163-1047(92)90248-3

- Díaz-Trujillo, A., Contreras, J., Medina, A. C., Silveyra-Leon, G. A., Quirarte, G. L., and Prado-Alcalá, R. A. (2009). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. *Neurobiol. Learn. Mem.* 91, 310–314. doi: 10.1016/j.nlm.2008.10.006
- Durán-Arévalo, M., Cruz-Morales, S. E., and Prado-Alcalá, R. A. (1990). Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Res. Bull.* 24, 725–727. doi: 10.1016/0361-9230(90)90129-N
- Fozzard, H. A., and Lipkind, G. M. (2010). The tetrodotoxin binding site is within the outer vestibule of the sodium channel. *Mar. Drugs* 8, 219–234. doi: 10.3390/md8020219
- Galindo, L. E., Garin-Aguilar, M. E., Medina, A. C., Serafin, N., Quirarte, G. L., and Prado-Alcalá, R. A. (2008). Acquisition and retention of enhanced active avoidance are unaffected by interference with serotonergic activity. *Behav. Brain Res.* 195, 153–158. doi: 10.1016/j.bbr.2008.01.011
- Garin-Aguilar, M. E., Medina, A. C., Quirarte, G. L., McGaugh, J. L., and Prado-Alcalá, R. A. (2014). Intense aversive training protects memory from the amnesic effects of hippocampal inactivation. *Hippocampus* 24, 102–112. doi: 10.1002/hipo.22210
- Giordano, M., and Prado-Alcalá, R. A. (1986). Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen. Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, 905–909. doi: 10.1016/0091-3057(86)90435-1
- Giustino, T. F., and Maren, S. (2015). The role of the medial prefrontal cortex in the conditioning and extinction of fear. *Front. Behav. Neurosci.* 9:298. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00298
- Heidbreder, C. A., and Groenewegen, H. J. (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 555–579. doi: 10.1016/j.neubiorev.2003.09.003
- Herrera, D. G., and Robertson, H. A. (1996). Activation of c-fos in the brain. *Prog. Neurobiol.* 50, 83–107. doi: 10.1016/S0304-0082(96)00021-4
- Hoover, W. B., and Vertes, R. P. (2007). Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct. Funct.* 212, 149–179. doi: 10.1007/s00429-007-0150-4
- Izquierdo, I., and McGaugh, J. L. (2000). Behavioral pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav. Pharmacol.* 11, 517–534. doi: 10.1097/00008877-200011000-00001
- Jinks, A. L., and McGregor, I. S. (1997). Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. *Brain Res.* 772, 181–190. doi: 10.1016/S0006-8993(97)00810-X
- Lazaro-Muñoz, G., LeDoux, J. E., and Cain, C. K. (2010). Sidman instrumental avoidance initially depends on lateral and basal amygdala and is constrained by central amygdala-mediated Pavlovian processes. *Biol. Psychiatry* 67, 1120–1127. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.12.002
- Lechner, H. A., Squire, L. R., and Byrne, J. H. (1999). 100 years of consolidation - Remembering Muller and Pilzecker. *Learn. Mem.* 6, 77–87.
- Malin, E. L., and McGaugh, J. L. (2006). Differential involvement of the hippocampus, anterior cingulate cortex, and basolateral amygdala in memory for context and footshock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 1959–1963. doi: 10.1073/pnas.0510890103
- McGaugh, J. L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153, 1351–1358. doi: 10.1126/science.153.3742.1351
- McGaugh, J. L. (2000). Memory—a century of consolidation. *Science* 287, 248–251. doi: 10.1126/science.287.5451.248
- Mello e Souza, T., Roesler, R., Madruga, M., de-Paris, F., Quevedo, J., Rodrigues, C., et al. (1999). Differential effects of post-training muscimol and AP5 infusions into different regions of the cingulate cortex on retention for inhibitory avoidance in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 72, 118–127. doi: 10.1006/nlme.1998.3892
- Müller, G. E., and Pilzecker, A. (1900). Experimentelle beitrage zur lehre vom gedachtniss. Leipzig: J. A. Barth.
- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th Edn. Washington, DC: National Academies Press.
- Parent, M. B., Tomaz, C., and McGaugh, J. L. (1992). Increased training in an aversively motivated task attenuates the memory-impairing effects of posttraining N-methyl-D-aspartate-induced amygdala lesions. *Behav. Neurosci.* 106, 789–797. doi: 10.1037/0735-7044.106.5.789
- Parent, M. B., West, M., and McGaugh, J. L. (1994). Memory of rats with amygdala lesions induced 30 days after footshock-motivated escape training reflects degree of original training. *Behav. Neurosci.* 108, 1080–1087. doi: 10.1037/0735-7044.108.6.1080
- Paxinos, G., and Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th Edn. Burlington, MA: Academic Press.
- Pérez-Ruiz, C., and Prado-Alcalá, R. A. (1989). Retrograde amnesia induced by lidocaine injection into the striatum: protective effect of the negative reinforcer. *Brain Res. Bull.* 22, 599–603. doi: 10.1016/0361-9230(89)90076-2
- Prado-Alcalá, R. A., and Cobos-Zapiain, G. G. (1977). Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a function of experience. *Brain Res.* 138, 190–196. doi: 10.1016/0006-8993(77)90797-1
- Prado-Alcalá, R. A., and Cobos-Zapiain, G. G. (1979). Interference with caudate nucleus activity by potassium chloride. Evidence for a “moving” engram. *Brain Res.* 172, 577–583. doi: 10.1016/0006-8993(79)90592-4
- Prado-Alcalá, R. A., Kaufman, P., and Moscona, R. (1980). Scopolamine and KCL injections into the caudate-putamen. Overtraining-induced protection against deficits of learning. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 12, 249–253. doi: 10.1016/0091-3057(80)90364-0
- Prado-Alcalá, R. A., Medina, A. C., Serafin, N., and Quirarte, G. L. (2012). Intense emotional experiences and enhanced training prevent memory loss induced by post-training amnesic treatments administered to the striatum, amygdala, hippocampus or substantia nigra. *Rev. Neurosci.* 23, 501–508. doi: 10.1515/revneuro-2012-0061
- Quirk, G. J., and Mueller, D. (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33, 56–72. doi: 10.1038/sj.npp.1301555
- Quiroz, C., Martínez, L., Quirarte, G. L., Morales, T., Díaz-Cintra, S., and Prado-Alcalá, R. A. (2003). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Exp. Brain Res.* 153, 400–402. doi: 10.1007/s00221-003-1704-1
- Riekkinen, P., Kuitunen, J., and Riekkinen, M. (1995). Effects of scopolamine infusions into the anterior and posterior cingulate on passive avoidance and water maze navigation. *Brain Res.* 685, 46–54. doi: 10.1016/0006-8993(95)00422-M
- Sacchetti, B., Baldi, E., Lorenzini, C. A., and Bucherelli, C. (2003). Role of the neocortex in consolidation of fear conditioning memories in rats. *Exp. Brain Res.* 152, 323–328. doi: 10.1007/s00221-003-1534-1
- Sagar, S. M., Sharp, F. R., and Curran, T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240, 1328–1331. doi: 10.1126/science.3131879
- Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavéz, M., Quirarte, G. L., Martínez García, M. I., and Prado-Alcalá, R. A. (2011). Enhanced training protects memory against amnesia produced by concurrent inactivation of amygdala and striatum, amygdala and substantia nigra, or striatum and substantia nigra. *Front. Behav. Neurosci.* 5:83. doi: 10.3389/fnbeh.2011.00083
- Santos-Anderson, R. M., and Routtenberg, A. (1976). Stimulation of rat medial or sulcal prefrontal cortex during passive avoidance learning selectively influences retention performance. *Brain Res.* 103, 243–259. doi: 10.1016/0006-8993(76)90797-6
- Solana-Figueroa, R., Salado-Castillo, R., Quirarte, G. L., Galindo, L. E., and Prado-Alcalá, R. A. (2002). Enhanced inhibitory avoidance training protects against the amnesic effect of p-chloroamphetamine. *Life Sci.* 71, 391–399. doi: 10.1016/S0024-3205(02)01684-3
- Sotres-Bayon, F., and Quirk, G. J. (2010). Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 231–235. doi: 10.1016/j.conb.2010.02.005
- Tang, J., Ko, S., Ding, H. K., Qiu, C. S., Calejesan, A. A., and Zhuo, M. (2005). Pavlovian fear memory induced by activation in the anterior cingulate cortex. *Mol. Pain* 1:6. doi: 10.1186/1744-8069-1-6
- Thatcher, R. W., and Kimble, D. P. (1966). Effect of amygdaloid lesions on retention of an avoidance response in overtrained and nonovertrained rats. *Psychonomic Sci.* 6, 9–10. doi: 10.3758/BF03327931
- Vertes, R. P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51, 32–58. doi: 10.1002/syn.10279
- Vertes, R. P. (2006). Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142, 1–20. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.06.027

- Vidal-Gonzalez, I., Vidal-Gonzalez, B., Rauch, S. L., and Quirk, G. J. (2006). Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learn. Mem.* 13, 728–733. doi: 10.1101/lm.306106
- Willoughby, J. O., Mackenzie, L., Medvedev, A., and Hiscock, J. J. (1997). Fos induction following systemic kainic acid: early expression in hippocampus and later widespread expression correlated with seizure. *Neuroscience* 77, 379–392. doi: 10.1016/S0306-4522(96)00462-9
- Yang, F. C., and Liang, K. C. (2014). Interactions of the dorsal hippocampus, medial prefrontal cortex and nucleus accumbens in formation of fear memory: difference in inhibitory avoidance learning and contextual fear conditioning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 112, 186–194. doi: 10.1016/j.nlm.2013.07.017
- Zhang, Y., Fukushima, H., and Kida, S. (2011). Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Mol. Brain* 4:4. doi: 10.1186/1756-6606-4-4
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2017 Torres-García, Medina, Quirarte and Prado-Alcalá. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.