



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**EXPRESIÓN DE EGR-1 EN LA AMÍGDALA DE RATA
DURANTE LA ADQUISICIÓN Y EVOCACIÓN EN LA PRUEBA
DE ENTERRAMIENTO DEFENSIVO CONDICIONADO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:

ALEJANDRA AIDALY HERNÁNDEZ JARAMILLO

Director: DR. MIGUEL A. PÉREZ DE LA MORA

Revisora: DRA. ALEJANDRA E. RUIZ CONTRERAS



México, D.F.

Octubre, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo de tesis fue realizado en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Miguel A. Pérez de la Mora. Gracias por el apoyo parcial de la Dirección General del Personal Académico (Claves de Proyectos: IN 203111 e IN 204314) y por el apoyo del Dr. Raúl Aguilar Robledo (Claves de Proyectos: IN 204811y CONACyT 128528).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a:

El Dr. Miguel A. Pérez de la Mora, por recibirme en su laboratorio y por el gran apoyo, paciencia y calidez que me brindó durante la realización de este proyecto.

El Dr. Raúl Aguilar Robledo, por su tiempo, enseñanza y asistencia técnica dentro de su laboratorio.

La Dra. Alejandra E. Ruiz Contreras, una admirable profesora que transmite entusiasmo y gran conocimiento. Gracias por la atención y el tiempo que me brindó.

Los miembros del jurado: el Dr. César Casasola C., el Dr. Octavio César García G. y el Dr. Gustavo Bachá M., por sus valiosas aportaciones que enriquecieron este trabajo.

La Técnica Académica Q.F.B. Minerva Crespo Ramírez, por su constante apoyo y comprensión que me ayudaron a lograr mi meta.

La Mtra. Patricia Romero S., excelente profesora de la Facultad de Psicología.

La Universidad Nacional Autónoma de México, por la educación que ha hecho posible mi formación profesional. Es un gran orgullo para mí poder ser egresada de esta institución.

Especialmente, agradezco a mi familia. A mis padres, por el cuidado y el apoyo que me han brindado, por todas las enseñanzas que me han transmitido, por haber sido para mí un modelo de perseverancia, fortaleza y dedicación y porque a ambos los admiro y los quiero mucho. Gracias a mi hermana, por su amor, comprensión y compañía, por compartir tantas experiencias juntas, porque su esfuerzo y decisión para lograr sus metas son para mí fuentes de motivación. Agradezco a mis amigos, por su cariño, su apoyo y valiosa amistad. A las personas con las que he compartido alegría y han estado a mi lado en momentos difíciles. Gracias por todo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	8
Capítulo 1. MIEDO.....	9
1.1 Descripción del miedo	9
1.2 Miedo no condicionado y condicionado	9
Capítulo 2. ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL MIEDO CONDICIONADO.....	11
2.1 Conductas defensivas	11
2.2 Modelos de condicionamiento de miedo	12
2.3 Prueba de enterramiento defensivo condicionado	13
Capítulo 3. PARTICIPACIÓN DE LA AMÍGDALA EN EL MIEDO CONDICIONADO.....	16
3.1 Antecedentes	16
3.2 La amígdala	17
3.2.1 <i>Estructura anatómica</i>	17
3.2.2 <i>Citoarquitectura y neurotransmisores</i>	20
3.3 Modulación del miedo condicionado	21
3.4 Participación de la amígdala en el enterramiento defensivo condicionado	26
Capítulo 4. APRENDIZAJE Y MEMORIA.....	27
4.1 Adquisición, consolidación y evocación	27
4.2 Plasticidad sináptica	28
4.3 Descripción de EGR-1	32
4.3.1 <i>Expresión de EGR-1 en la amígdala</i>	33
Capítulo 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVO E HIPÓTESIS.....	36

5.1 Planteamiento del problema	36
5.2 Pregunta de investigación	36
5.3 Objetivo	37
<i>5.3.1 Objetivos específicos</i>	37
5.4 Hipótesis	37
Capítulo 6. MÉTODO.....	38
6.1 Diseño de investigación	38
6.2 Sujetos	38
6.3 Escenario	38
6.4 Equipo y material	39
6.5 Procedimiento	40
<i>6.5.1 Prueba de enterramiento defensivo condicionado</i>	40
<i>6.5.2 Técnica inmunohistoquímica</i>	43
<i>6.5.3 Estereología</i>	45
6.6 Análisis de datos	48
Capítulo 7. RESULTADOS.....	49
7.1 Análisis conductual	49
7.2 Expresión de EGR-1 en la amígdala	53
Capítulo 8. DISCUSIÓN.....	58
8.1 Prueba de enterramiento defensivo condicionado	58
8.2 Expresión de EGR-1	59
8.3 Limitaciones	65
8.4 Perspectivas	66
Capítulo 9. CONCLUSIÓN	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

ABREVIATURAS

AMPA	Receptores α -amino-3 hidroxil-5 metil-4 isoxazolepropionico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BLA	Núcleo basolateral de la amígdala
BNST	Núcleo cama de la estría terminal
CeA	Núcleo central de la amígdala
EC	Estímulo condicionado
EGR-1	Factor de respuesta de crecimiento temprano-1 (en minúsculas se refiere al gen o ARN)
EI	Estímulo incondicionado
GABA	Ácido gama-amino-butírico
HIPP	Hipocampo
HYPO	Hipotálamo
IEG	Gen de expresión temprana
IIP	Islas intercaladas paracapsulares
ml	Isla principal
La	Núcleo lateral de la amígdala
LC	Locus coeruleus
LTP	Potenciación a largo plazo
NA	Núcleo accumbens

NMDA	N-metil-D-aspartato
NTS	Núcleo del tracto solitario
PAG	Sustancia gris periacueductal
PB	Núcleo parabraquial
PFC	Corteza prefrontal
RPC	Núcleo reticular pontino caudado
THAL	Tálamo
VTA	Área ventral tegmental

RESUMEN

Cuando un animal percibe un estímulo que amenaza su integridad implementa conductas defensivas tendientes a enfrentar dicha situación. Al mismo tiempo que esto ocurre, el animal genera recuerdos sobre ese evento que le permitirán predecir el peligro en futuras ocasiones y así, aumentar su probabilidad de sobrevivencia. Dichos recuerdos se forman a partir de cambios moleculares que dan como resultado la síntesis de algunas proteínas, entre las que se encuentra el “factor de respuesta de crecimiento temprano-1” (“early growth response-1 factor”) mejor conocido por sus siglas en inglés como EGR-1, cuya expresión parece ser importante tanto para la adquisición del miedo condicionado como para su evocación. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados, persisten notables discrepancias en los resultados que se han reportado hasta ahora y se desconoce si esos hallazgos pueden generalizarse a otros modelos de condicionamiento, tal como el enterramiento defensivo condicionado, que cuenta con una sólida base etológica y permite condicionar rápidamente la respuesta de enterramiento. Con base en lo anterior, y dado el papel preponderante que juega la amígdala en el condicionamiento del miedo, en este trabajo se ha estudiado el patrón de expresión amigdalina de la proteína EGR-1 utilizando dicho modelo. Los resultados obtenidos indican que hubo un incremento en la expresión de EGR-1 en los núcleos lateral, basolateral y central, durante la adquisición y la evocación del enterramiento defensivo condicionado. Estos resultados son discutidos a la luz del papel que dichas regiones juegan en el miedo condicionado.

Capítulo 1

MIEDO

1.1 Descripción del miedo

El miedo es un estado que surge en respuesta a un estímulo específico interpretado como peligroso y motiva al sujeto para su defensa (Aggleton, 1992; Reeve, 2003; Johansen et al., 2011). Las situaciones más comunes que disparan el miedo son las que hacen que el sujeto anticipe que sus habilidades de enfrentamiento no podrán adaptarse a las circunstancias por venir (Orsini y Maren, 2012).

En animales y humanos, el miedo se caracteriza principalmente por las siguientes manifestaciones (Davis, 1997):

- Endócrinas: elevación de los niveles sanguíneos de cortisol, adrenalina y noradrenalina.
- Autónomas: taquicardia, taquipnea, hipertensión arterial, palpitaciones, palidez, sudoración y alteraciones de la función gastro-intestinal.
- Somáticas: aumento de la tensión muscular y de los reflejos musculotendinosos.
- Conductuales: inmovilidad, escape y/o evitación.

1.2 Miedo no condicionado y condicionado

Miedo no condicionado

Existen miedos que pueden tener su origen en la herencia evolutiva, es decir, que tienen una base innata o no condicionada (De Cantazaro, 2001). Este tipo de miedo surge ante estímulos que representan peligros frecuentes para muchas especies mamíferas y no está asociado a cualquier estímulo elegido arbitrariamente, por lo que tienen un claro valor adaptativo y es esencial para la sobrevivencia. Esto incluye el miedo a las serpientes, a las alturas, a los grandes animales depredadores, entre otros (De Cantazaro, 2001).

Miedo condicionado

Aunque algunos miedos pueden ser innatos, muchos miedos pueden ser adquiridos o condicionados. Los animales son capaces de usar estímulos de su entorno, como texturas, luz, ruidos, etc. para determinar si se encuentran en peligro y poder responder a ello anticipadamente, aumentando su probabilidad de sobrevivencia (Orsini y Maren, 2012). De esta manera, los organismos pueden adaptarse al entorno que los rodea por medio de cambios en su comportamiento generados de acuerdo a las experiencias individuales y dichos cambios se pueden conservar en el tiempo (Dudai, 2004).

Capítulo 2

ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL MIEDO CONDICIONADO

A pesar de las diferencias en tamaño y complejidad de los cerebros entre los vertebrados, los sistemas neurales que intervienen para detectar el peligro y producir respuestas defensivas están evolutivamente conservados y son bastante similares (LeDoux, 2012). Con base en lo anterior, el estudio de las respuestas de miedo y sus correlatos anatómicos y fisiológicos, ha sido posible gracias al uso de modelos experimentales que usan animales (Phelps y LeDoux, 2005; Papini, 2009). Una aproximación al estudio del miedo condicionado, es a través de las conductas defensivas, las cuales se describen a continuación.

2.1 Conductas defensivas

Existen estímulos aversivos que provocan respuestas innatas, las cuales evolucionaron, ya que son una defensa exitosa en contra del daño (Domjan, 2010). A este tipo de respuestas Bolles (1970) las denominó *reacciones de defensa específicas de la especie* (citado en De Cantazaro, 2001; Domjan, 2010). Estas conductas varían de manera predecible de acuerdo con las características específicas del estímulo peligroso, el tiempo de exposición a éste y las oportunidades conductuales disponibles (Gómez, 2002; Domjan, 2010). Por ejemplo, en las ratas, este tipo de reacciones incluyen huir (correr), la inmovilidad (inactividad del cuerpo excepto por la respiración), ataques defensivos, la tigmotaxia (aproximarse a las paredes), la búsqueda de áreas oscuras y el enterramiento defensivo (De Cantazaro, 2001; Domjan, 2010).

Por último, cabe mencionar que las conductas defensivas han sido clasificadas en dos tipos: reactivas y activas. Las primeras, como la inmovilidad, aumentan la probabilidad de sobrevivencia de un animal, disminuyendo la posibilidad de ser detectado por un depredador. Las conductas defensivas activas, como poner distancia física entre el sujeto y lo que es temido para evitar un estímulo aversivo, permiten ejercer mayor control sobre la situación amenazante (Gómez, 2002; Lázaro-Muñoz, 2010).

2.2 Modelos de condicionamiento de miedo

En un laboratorio, se utiliza comúnmente el condicionamiento clásico del miedo para estudiar como los organismos aprenden a predecir el peligro a partir de sus experiencias previas (Paré et al., 2004). Este consiste en presentar repetidamente un estímulo sensorial inocuo, llamado estímulo condicionado (EC), emparejado con un estímulo nocivo, denominado estímulo incondicionado (EI), como una descarga eléctrica, la cual genera una respuesta incondicionada (RI). Después de algunos ensayos, el animal aprende que el EC, que puede ser un estímulo diferenciado (como un tono o una luz), o las señales contextuales del lugar donde se presentó el estímulo aversivo, predice la ocurrencia del EI y adquiere la propiedad de inducir por sí mismo la aparición de respuestas denominadas condicionadas (RC) (Domjan, 2010). La respuesta defensiva más comúnmente evaluada en ratas es la de inmovilidad, cuya medición directa es un indicador del miedo condicionado. Además, es posible obtener medidas indirectas de dicha conducta mediante procedimientos de *supresión condicionada*. Uno de estos procedimientos es la “respuesta emocional condicionada”, en el que las ratas son entrenadas para presionar una palanca que ocasiona la entrega de comida en una pequeña cámara experimental. Una vez que las ratas presionan la palanca a una tasa estable, se inicia el condicionamiento del miedo, el cual consiste en el emparejamiento de un tono o una luz con una breve descarga eléctrica en las patas; a medida que las ratas adquieren el miedo condicionado, se llega a suprimir la presión de la palanca durante el EC. Otro procedimiento de supresión condicionada es el de “supresión del lengüeteo”, en el que a ratas previamente privadas de líquido, se les presenta un EC temido (como un tono) y se registra la conducta de lengüeteo del bebedero en una cámara experimental; en este caso, el miedo condicionado se mide por la latencia para completar cierto número de lengüeteos (Domjan, 2010). Otra *reacción de defensa específica de la especie* que puede ser evaluada durante un procedimiento de condicionamiento, es el enterramiento defensivo (DeBoer y Koolhaas, 2003), el cual será descrito con detalle más adelante en este capítulo.

Por otra parte, existen modelos con base en el condicionamiento instrumental, que permiten medir conductas como la evitación. Entre ellos se encuentran el modelo Sidman de evitación señalizado (véase Moscarello y LeDoux, 2013) y el no señalizado (véase Lázaro-Muñoz et al., 2010). Cabe mencionar, que de acuerdo a la teoría de las *reacciones de defensa específicas de la especie*, en los experimentos de evitación algunas respuestas se aprenden con mayor facilidad que otras (Domjan, 2010). Por ejemplo, es fácil que una rata aprenda a correr para evitar recibir un estímulo aversivo, pero es más difícil si tiene que presionar una palanca para escapar del peligro. Por lo tanto, debido a que este tipo de modelos requieren de un entrenamiento, demandan mayor tiempo por la complejidad de la tarea (De Cantazaro, 2001).

2.3 Prueba de enterramiento defensivo condicionado

Entre las pruebas diseñadas para evaluar el comportamiento de los animales que se someten a condiciones que les causan aversión, destaca la prueba de enterramiento defensivo condicionado, introducida por Pinel y Treit (1978) en el campo de la investigación neurocientífica y psicofarmacológica (citado en DeBoer y Koolhaas, 2003). Dicho modelo explota la tendencia natural de los roedores a enterrar todo aquello que los agrede o pudiera hacerlo (De Boer y Koolhaas, 2003).

Se ha observado que cuando estos animales se enfrentan a un estímulo perturbador localizado, despliegan un patrón conductual específico dirigido a ocultar ese estímulo (Terlecki et al., 1979). Esta conducta se conoce como “enterramiento defensivo”, la cual, es una conducta innata en los roedores dirigida hacia el origen del estímulo que representa una amenaza (De Boer y Koolhaas, 2003); depende de la disponibilidad de material para enterrar, se asocia con estímulos perturbadores discretos (como energía eléctrica de bajo amperaje, comida nociva, congéneres muertos, luz, ruido, etc.) y parece tener su paralelo evolutivo en la conducta de bloqueo de túneles desplegada por los animales excavadores (De Cantazaro, 2001; Gómez, 2002).

Para llevar a cabo esta prueba se utiliza una caja de experimentación con paredes de acrílico transparente y con una cama de aserrín de cinco centímetros de grosor. En una pared y dos centímetros por encima de la cama de aserrín, se encuentra fijo un electrodo (Terlecki et al., 1979). La prueba comienza colocando una rata dentro de la caja para que la explore libremente. Eventualmente, cuando el animal hace contacto por medio de su nariz, hocico, cola o patas con el electrodo, recibe una descarga eléctrica de baja intensidad. La respuesta inmediata de la rata es retirarse al extremo opuesto de la caja, pero al poco tiempo tiende a regresar para examinar el electrodo nuevamente, recibiendo una descarga cada vez que lo toca. Tras un período de latencia variable contabilizado a partir de la primera descarga, el animal inicia la conducta defensiva de enterramiento mediante movimientos de sus patas delanteras que arrojan aserrín en dirección al electrodo. Al día siguiente del condicionamiento, se lleva a cabo una prueba de memoria, colocando al animal en la misma caja, pero esta vez sin corriente eléctrica (De Boer y Koolhaas, 2003).

Además del enterramiento, en el transcurso de la prueba el animal puede exhibir conductas como: 1) inmovilidad, que se refiere al cese del movimiento, a excepción del necesario para la respiración, 2) levantar el cuerpo apoyándose en las patas traseras, y con menor frecuencia 3) ambulación, es decir, el desplazamiento horizontal dentro de la caja, 4) acicalamiento, que incluye limpiarse y/o rascarse la cara y el cuerpo y 5) aproximación al electrodo, manteniendo una postura de atención y vigilancia pero sin hacer contacto físico con éste (De Boer y Koolhaas, 2003).

Durante toda la sesión, el animal es videograbado para hacer un análisis sobre las conductas más frecuentemente evaluadas por medio de los siguientes parámetros: a) número de episodios de enterramiento, b) tiempo de enterramiento, c) aproximaciones al electrodo, d) latencia del primer episodio de enterramiento, e) número de descargas eléctricas recibidas y f) reactividad a las descargas eléctricas (Treit et al., 1994).

La principal ventaja de este tipo de modelo experimental es que los animales están predispuestos a mostrar conductas defensivas que son parte del repertorio natural de la especie y por lo tanto, el condicionamiento se lleva a cabo rápidamente, incluso en un solo ensayo, dependiendo de las condiciones experimentales utilizadas (De Cantazaro, 2001; De Boer y Koolhaas, 2003).

Capítulo 3

PARTICIPACIÓN DE LA AMÍGDALA EN EL MIEDO CONDICIONADO

3.1 Antecedentes

A finales de los 30', Klüver y Bucy encontraron que los monos *Rhesus* con ablación del lóbulo temporal medial, incluyendo la amígdala, el hipocampo y la corteza temporal, mostraban conductas anormales como pérdida de la reactividad emocional (expresión de miedo y agresión), agnosia visual, aumento de la conducta de exploración, tendencia a examinar los objetos con la boca, tocar cualquier estímulo sin discriminación del peligro potencial e hipersexualidad. A este conjunto de síntomas se les denominó "síndrome de Klüver-Bucy". Debido a que las lesiones realizadas por Klüver y Bucy incluían varias estructuras cerebrales, Weiskrantz (1956), realizó lesiones limitadas estrictamente a la amígdala y observó el mismo patrón conductual, especialmente la pérdida de miedo (citado en Maren y Orsini, 2012).

Posteriormente, se llevaron a cabo otros estudios con los que se demostró la participación de la amígdala en el aprendizaje y la formación de recuerdos de miedo en humanos. En uno de ellos, se observó que los pacientes con lesión unilateral de la amígdala tuvieron déficit en la adquisición en el condicionamiento de la respuesta galvánica de la piel (LeBar et al., 1995).

Se ha llevado a cabo una gran cantidad de estudios de condicionamiento del miedo en animales, uno de los primeros y con gran impacto fue el realizado por Blanchard y Blanchard (1972), en el que mostraron que la lesión restringida a la amígdala de ratas impedía la adquisición de la respuesta de inmovilidad utilizando el modelo de condicionamiento al contexto, en el cual los animales aprenden a asociar un choque eléctrico con el ambiente en donde lo recibieron (citado en Rosen y Doley, 2006). Asimismo, en ratas a las que se lesionó la amígdala con un agente neurotóxico, se observó un déficit en el almacenamiento de recuerdos recientes y remotos de la respuesta de inmovilidad condicionada a un tono (Gale et al., 2004).

Por otro lado, Lázaro-Muñoz et al. (2010), llevaron a cabo un estudio en donde realizaron lesiones electrolíticas en la amígdala y después condicionaron la respuesta de evitación por medio del modelo Sidman no señalizado, en el que las ratas tienen que aprender a desplazarse entre dos compartimentos de un aparato para evitar la presentación de un choque eléctrico en las patas y observaron un déficit en la adquisición de la respuesta de evitación, lo cual sugirió la participación de la amígdala en el condicionamiento de esta conducta (Lázaro-Muñoz et al., 2010).

Hasta ahora, se ha reconocido la importante función que tiene la amígdala en el condicionamiento de conductas defensivas (Davis, 2001; LeDoux, 2000; Maren, 2005), sin embargo, el sitio de almacén del recuerdo del miedo a largo plazo todavía no es claro. Es posible que el almacenamiento ocurra en la amígdala ó alternativamente, que el almacenamiento esté distribuido e involucre interacciones entre la amígdala, la corteza y otras áreas (LeDoux, 2000; Paré, 2003).

3.2 La amígdala

3.2.1 Estructura anatómica

El término *amígdala* (almendra), fue empleado por primera vez en 1819 por el anatomista Karl Friedrich Burdach para denominar una estructura con forma de almendra ubicada en el lóbulo temporal medial (citado en Davis y Whalen, 2001). Ver fig. 1.

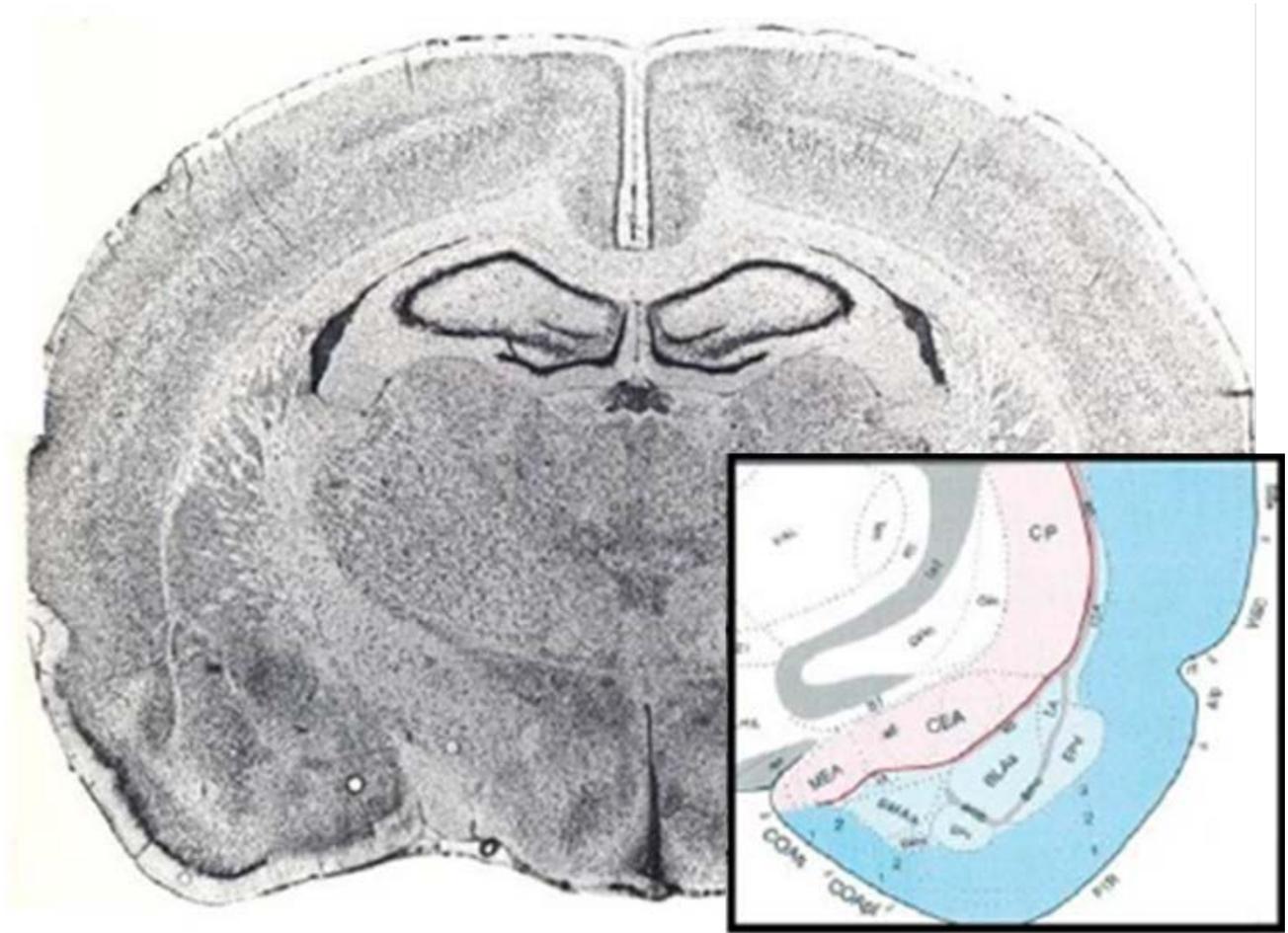


Fig. 1. Corte coronal de cerebro de rata teñido con la técnica de Nissl. Del lado derecho de la figura se ubica una representación esquemática en donde se pueden localizar los principales núcleos de la amígdala y las estructuras que los rodean (imagen tomada y modificada de Swanson y Petrovich, 1998). LA: núcleo lateral, BLA: núcleo basolateral, CeA: núcleo central, CP: caudado putamen, VAL: complejo ventral anterior lateral del tálamo, VPL: núcleo ventral posterolateral del tálamo, VM: núcleo ventral medial del tálamo, ZI: zona incierta, RT: núcleo reticular del tálamo, Int: cápsula interna, LHA: área hipotalámica lateral, GPM: globus pallidus medial, SI: sustancia innominata, Opt: tracto óptico, BMA: núcleo basomedial de la amígdala, MeA: núcleo medial de la amígdala, EPd: núcleo endopiriforme, COAa: núcleo cortical de la amígdala anterior, COApI: núcleo cortical de la amígdala posterior, PIR: corteza piriforme, Apl: área insular agranular, VISC: área visceral, SS: área somatosensorial y amc: cápsula amigdalar.

Aunque la amígdala es un complejo conglomerado, las regiones más relevantes en el miedo condicionado son los núcleos lateral (La), basolateral (BLA), central (CeA) y las islas intercaladas paracapsulares (IIP) (de acuerdo a la nomenclatura De Olmos et al., 2004). Cabe mencionar que por algunos autores, el núcleo BLA es conocido como basal (B) y el núcleo basomedial como accesorio basal (AB). Adicionalmente, se ha empleado el término complejo basolateral para agrupar a los núcleos La, BLA y en ocasiones el AB (LeDoux, 2000; Maren, 2005). Ver fig 2.

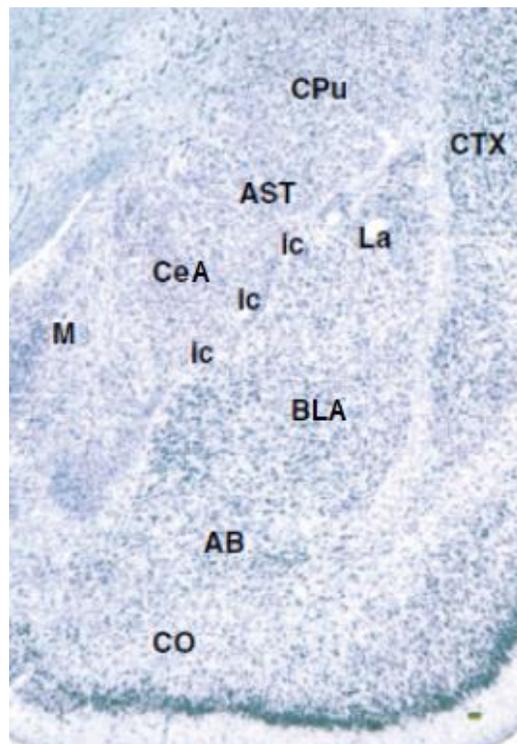


Fig. 2. Amígdala con tinción de Nissl. Se indican los principales núcleos de la amígdala. La: núcleo lateral, BLA: núcleo basolateral, CeA: núcleo central, Ic: islas intercaladas (también conocidas como IIP), AB: núcleo basal accesorio, M: núcleo medial, CPu: caudado putamen, CO: núcleo cortical, AST: área de transición amigdalo-estriatal, CTX: corteza. (modificado de LeDoux, 2000).

3.2.2 Citoarquitectura y neurotransmisores

La amígdala es una estructura heterogénea en cuanto a su composición celular (Pérez de la Mora et al., 2007). El La es el núcleo más grande dentro del complejo basolateral, las neuronas que lo componen tienen un soma que mide de 10-15 μm de diámetro. En comparación, el núcleo BLA está formado por neuronas con un soma de 15-20 μm de diámetro y su tamaño va de las más grandes en la parte anterior a las más pequeñas en la parte posterior (Orsini y Maren, 2012).

En el complejo basolateral existen dos tipos de neuronas: las neuronas piramidales que representan el 80%, son grandes, densas en espinas dendríticas y liberan glutamato. Estas neuronas forman sinapsis con muchas otras neuronas del complejo basolateral y forman la mayoría de las conexiones extrínsecas fuera de esa estructura. El 20% de las neuronas restantes son interneuronas gabaérgicas, las cuales forman la mayoría de los circuitos locales (Orsini y Maren, 2012).

Entre los neurotransmisores presentes en la amígdala destacan por su abundancia e importancia en la modulación del miedo, el glutamato y el ácido gama-amino-butírico, GABA (por sus siglas en inglés). Además de estos, se ha encontrado una gran variedad de neurotransmisores como la dopamina, la noradrenalina, la serotonina, la colecistoquinina, el péptido intestinal vasoactivo, el neuropéptido Y, opioides, sustancia P y progesterona (Pérez de la Mora et al., 2007).

Cada uno de los núcleos de la amígdala tiene una función particular de acuerdo con las características que los distinguen. A continuación se explicará la participación de los principales núcleos de la amígdala y su interacción con otras estructuras para la expresión de las respuestas defensivas condicionadas.

3.3 Modulación del miedo condicionado

Cuando un animal percibe una amenaza, ciertos tipos de respuestas son inhibidas (por ejemplo, la alimentación y la reproducción), todo el organismo se activa, la atención es centrada en estímulos relevantes externos e internos, sistemas motivacionales son puestos en marcha y se hace posible el aprendizaje y la formación del recuerdo de esa experiencia aversiva (Davis y Whalen, 2001; Rosen, 2006; LeDoux, 2012).

El proceso neurofisiológico por medio del cual ocurre lo descrito con anterioridad inicia cuando la información concerniente al estímulo nocivo es transmitida por las vías sensoriales hacia el tálamo, excepto la del olfato, que tiene conexión directa con la amígdala. El tálamo puede enviar la información por dos caminos, uno es conocido como la “vía corta” y otro como “la vía larga” (Phelps y LeDoux, 2005). La primera lleva información directa del tálamo hacia la amígdala, lo cual genera una representación del estímulo rápida y suficiente para darnos cuenta de si el estímulo es amenazante o no. La vía larga consta de proyecciones que van del tálamo hasta las cortezas sensoriales, lo cual permite generar una representación más detallada y compleja del estímulo amenazante (Phelps y Ledoux, 2005; Rosen y Donley, 2006). Ver fig. 3.

A continuación, la información proveniente del tálamo y de las cortezas sensoriales (primarias y de asociación), ingresa a la amígdala a través del complejo basolateral (Phelps y LeDoux, 2005) y, dentro de este, las células de la porción dorsolateral del núcleo La (LaDL) reciben la mayoría de las aferencias corticales y subcorticales de la vía visual, auditiva y somatosensorial y parece tener una función relevante en el condicionamiento del miedo al asociar e integrar la información sensorial de los estímulos condicionado e incondicionado (Johansen et al., 2011; Osini y Maren, 2012), lo cual se abordará con mayor detalle en el siguiente capítulo. A su vez, el núcleo La envía proyecciones masivas hacia la porción basal del complejo BLA, al BM y a la porción lateral del CeA (LeDoux, 2000). Por su parte, el núcleo BLA, además de recibir información directa de las cortezas sensoriales, recibe aferencias del hipocampo,

específicamente desde el área CA1 ventral y el subiculum, que le transmiten información multimodal concerniente al contexto que definen el tiempo y espacio de las experiencias aversivas (LeDoux, 2000; Maren, 2005; Orsini y Maren, 2012). Desde este núcleo y desde el BM se envían eferencias hacia el CeA, pero a su porción medial (LeDoux, 2000).

Como se mencionó anteriormente, el complejo BLA envía proyecciones hacia el CeA, pero además, hacia la porción lateral del núcleo cama de la estría terminal (BNST), el hipocampo, la corteza prefrontal, el estriado y el núcleo accumbens (Rosen y Donley, 2006; Lázaro-Muñoz, et al. 2010; Orsini y Maren, 2012) (ver fig. 3), estructuras que estarían participando en funciones como:

- Hipocampo, sería importante para la consolidación de recuerdos emocionales (Hall et al., 2000; Sierra-Mercado et al., 2011).
- Corteza prefrontal, participaría en la formación de recuerdos de eventos emocionales y en la toma de decisiones (Sierra-Mercado et al., 2011; Moscarello y LeDoux, 2013).
- Estriado, participaría promoviendo la conducta defensiva activa de evitación (Darvas et al., 2011).
- Núcleo accumbens, participaría en la motivación para organizar conductas defensivas activas (LeDoux, 2012).

Es importante señalar, sin embargo, que la transmisión de los impulsos nerviosos entre el complejo BLA y el núcleo CeA y, particularmente, con su porción medial, en donde se encuentran localizadas las neuronas eferentes que controlan las respuestas autonómicas y muchas de las respuestas hormonales de un sujeto, no ocurre en forma directa sino a través de una interfaz inhibitoria, formado por neuronas gabaérgicas localizadas en las islas intercaladas paracapsulares (IIP, por sus siglas en inglés) y la isla principal (Im, por sus siglas en inglés). Tales neuronas gabaérgicas ejercen una inhibición tónica sobre las neuronas glutamatérgicas o peptidérgicas del núcleo CeA y del BNST que proyectan hacia centros autónomos involucrados en la expresión de miedo. En virtud de tal disposición anatómica, las neuronas de las IIP e Im mantienen

inhibida la comunicación entre el complejo BLA y la porción medial del CeA, de manera que para que la expresión del miedo se haga patente, estas neuronas deberán ser inhibidas. Tal inhibición parece estar a cargo de neuronas gabaérgicas de las islas intercaladas localizadas, para el caso de la rata, en una posición más dorsal (Pérez de la Mora et al., 2010).

Por último, se ha sugerido que el CeA puede influir en la actividad de la amígdala debido a la información autonómica/visceral que recibe (LeDoux, 2000) debido a que este núcleo integra información del complejo basolateral y del BM pero además, ésta puede ser modificada por la información nociceptiva que le es proyectada a este núcleo desde la médula espinal y el núcleo trigémino a través del complejo parabraquial (LeDoux, 2000). A su vez, este núcleo envía abundantes proyecciones hacia a la división lateral del BNST, el cual forma parte de lo que se ha denominado la amígdala extendida lateral y finalmente, tanto el CeA, como el BNST envían numerosas proyecciones (ver fig. 3) hacia los centros responsables de las reacciones endócrinas, autónomas y conductuales del miedo, (LeDoux, 2000; Davis y Whalen, 2001; Maren, 2005), como son:

- *Núcleo cama de la estría terminal (BNST)* que envía proyecciones a casi todas las regiones inervadas por el núcleo CeA. Dicha estructura, además de su papel modulador del eje hipotálamo-pituitario-adrenal, se le ha relacionado con la conducta de inmovilidad.
- *Hipotálamo*. El núcleo paraventricular hipotalámico principalmente media la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal conocido como el “eje del estrés”, cuya activación da como resultado la liberación de corticosteroides hacia el plasma sanguíneo. Por su lado, el hipotálamo lateral estaría involucrado en la activación del sistema nervioso autónomo simpático, dando lugar a respuestas como la dilatación pupilar, la palidez, la respuesta galvánica de la piel, la taquicardia y la elevación de la presión sanguínea, entre otras.
- *Sustancia gris periacueductal*. Involucrada en la respuesta de inmovilidad.

- *Núcleo motor dorsal del nervio vago y núcleo del tracto solitario.* Están involucrados en la modulación de la frecuencia cardíaca y la presión sanguínea.
- *Núcleo parabraquial.* Participa en cambios de la frecuencia respiratoria.
- *Área ventral tegmental.* Libera dopamina en regiones inervadas por la vía mesolímbica, incluyendo a la amígdala y produce un aumento de metabolitos dopaminérgicos en la corteza prefrontal medial.
- *Núcleo reticular pontino caudado.* Participa en la respuesta de sobresalto.
- *Locus coeruleus.* Modula los procesos de atención, vigilancia y alertamiento.
- *Núcleo motor facial y trigémino.* Participan en la expresión facial de miedo.

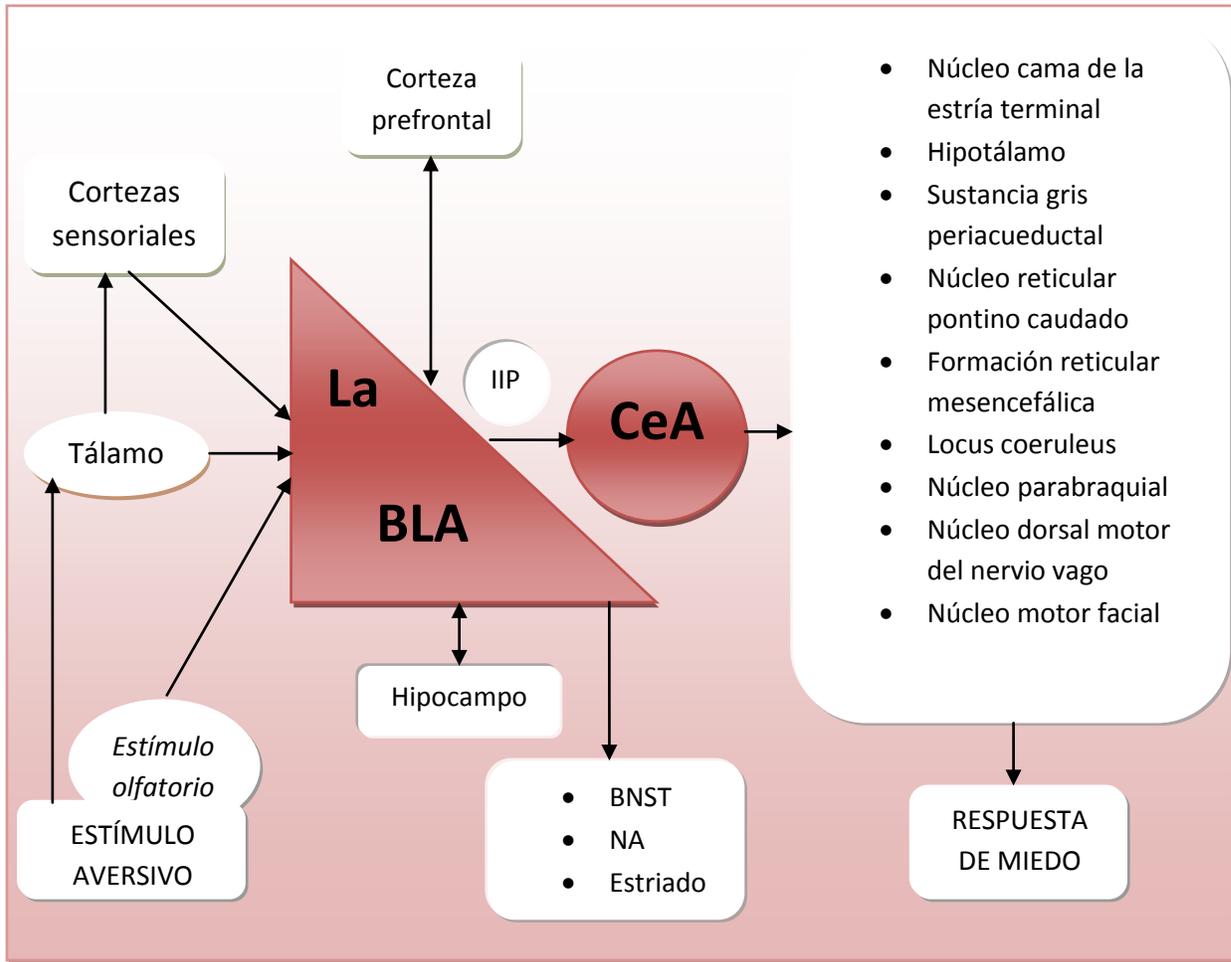


Fig. 3. Esquema sobre conectividad de la amígdala en la modulación del miedo. El proceso inicia por la entrada de la información del estímulo amenazante y su transmisión por las vías sensoriales hasta el tálamo de ahí, la información va directamente a la amígdala o primero se transmite a la corteza y después a la amígdala. En la amígdala, el BLA procesa la información y la envía al CeA, el cual se comunica con núcleos responsables de generar las respuestas autónomas, endócrinas y conductuales de miedo. El BLA tiene conexión bidireccional con el hipocampo y la corteza y envía proyecciones hacia el BNST, el NA y el estriado. BNST: n. cama de la estría terminal, NA: núcleo accumbens (LeDoux, 2000; Davis y Whalen, 2001 y Rosen y Donley, 2006).

3.4 Participación de la amígdala en el enterramiento defensivo condicionado

Con base en las evidencias del importante papel de la amígdala en el condicionamiento de las respuestas defensivas (LeDoux, 2000). Lehnman y Treit, (2003), realizaron un estudio que consistió en inactivar temporalmente la amígdala con la administración de tetradoxina previamente a la sesión de condicionamiento y observaron un incremento en el número de contactos con el electrodo y por lo tanto, de descargas eléctricas que las ratas recibieron, es decir, que hubo una disminución del miedo durante la adquisición; sin embargo, cuatro días después, observaron que los animales tuvieron menor número de aproximaciones al electrodo sin corriente eléctrica, lo cual indicó que a pesar de la inactivación de la amígdala, las ratas aprendieron a asociar la descarga eléctrica con el electrodo (Lehnman y Treit, 2003).

Una característica distintiva de la prueba de enterramiento defensivo condicionado, es que el animal puede presentar tanto la conducta defensiva activa de enterramiento, como la pasiva de congelamiento. Con base en ello, Roozendaal et al. (1991), tuvieron el interés en estudiar si la amígdala participaba en la regulación de estos dos tipos de conductas utilizando este modelo conductual. En este estudio, a un grupo de ratas le realizaron lesiones electrolíticas en el CeA previamente a la adquisición y a otro grupo, después de la adquisición. Observaron que la lesión en ambos grupos de ratas tuvo un efecto en la conducta de inmovilidad, es decir, hubo una disminución en el tiempo que las ratas dedicaron a esta conducta en comparación del grupo control (ratas sin lesión), tanto en la adquisición como en la prueba de memoria. Asimismo, reportaron que la lesión en el CeA previa al entrenamiento incrementó la conducta de enterramiento durante la adquisición. A partir de sus resultados, estos autores sugirieron que este núcleo de la amígdala podría estar participando en la regulación de la adquisición y la evocación de la conducta de inmovilidad (Roozendaal et al., 1991).

Capítulo 4

APRENDIZAJE Y MEMORIA

El aprendizaje es un cambio relativamente permanente en el comportamiento que refleja una adquisición de conocimientos o habilidades a través de la experiencia (Papalia et al., 2010). Como una propiedad del sistema nervioso, el aprendizaje depende de las propiedades plásticas de los circuitos cerebrales que son capaces de reorganizar funcionalmente las representaciones del mundo en respuesta a cambios en la información relevante entrante (Bermúdez-Rattoni, 2007). El aprendizaje es capaz de perdurar para luego ser utilizado de nuevo en caso de ser necesario. Al proceso por el cual se codifica, almacena y evoca información se le denomina memoria (Kandel et al. 2000).

4.1 Adquisición, consolidación y evocación

La memoria, medida por los cambios en la conducta del animal tiempo después del aprendizaje, refleja procesos como la adquisición, consolidación y evocación (Abel y Lattal, 2001). A continuación se define a cada uno de ellos:

- **Adquisición.** Se refiere al cambio que ocurre en el desempeño conductual durante un entrenamiento que se toma como la representación de aprendizaje (Dudai, 2002). En el condicionamiento del miedo, se entrena a un animal para que aprenda una asociación entre un EC y un EI (Abel y Lattal, 2001).
- **Consolidación.** Es el proceso por el que la información recién adquirida se estabiliza en una forma más permanente. En esta fase se forma la memoria de largo plazo a partir de la memoria de corto plazo (Rodrigues et al, 2004; Orsini y Maren, 2012).
- **Evocación.** Es el proceso por el cual un recuerdo previamente almacenado es utilizado por un organismo (Rozenzweig y Leiman, 1992). Se induce al exponer nuevamente al animal al estímulo neutro que se le presentó de

manera contingente con un estímulo aversivo para determinar si ocurrió el aprendizaje y si se formó la recuerdo de largo plazo (Abel y Lattal, 2001).

La formación de un recuerdo es resultado de cambios que ocurren en los circuitos neurales que procesan esa información (Bermúdez-Rattoni, 2007). A continuación se describen los mecanismos celulares y moleculares que están involucrados en este proceso.

4.2 Plasticidad sináptica

La plasticidad sináptica es la base fundamental del aprendizaje y la formación de la memoria y se refiere al cambio en la fuerza de las conexiones sinápticas (Bliss y Collingridge, 1993). Dichos cambios en las sinapsis ocurren a través de mecanismos celulares como la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés). Este fenómeno puede ser inducido en una vía neuronal específica por estimulación de alta frecuencia o tetánica y ha sido ampliamente utilizado para estudiar la plasticidad sináptica que subyace a la consolidación de un recuerdo (Bliss y Collingridge, 1993; Johansen et al., 2011).

La LTP tiene dos fases: temprana y tardía. La fase temprana dura sólo minutos, es independiente de la síntesis de RNA y proteínas y se cree que está involucrada en la modificación de las proteínas ya existentes. La fase tardía puede durar minutos, horas o incluso días, depende de la síntesis de RNA y de proteínas y está involucrada en las modificaciones estructurales en las sinapsis (Orsini y Maren, 2012).

La plasticidad sináptica necesaria para la asociación de los estímulos condicionado e incondicionado en la amígdala durante la formación de un recuerdo de miedo puede llevarse a cabo tras la inducción de la LTP. De hecho, se ha sugerido que tanto el condicionamiento del miedo, como la inducción de la LTP pueden dar como resultado cambios sinápticos en neuronas del núcleo La (Johansen et al., 2011). Rogan et. al. (1997), fue uno de los primeros en demostrar que los cambios en neuronas del La después del condicionamiento del

miedo, son los mismos que se observan típicamente tras la inducción de la LTP (citado en Orsini y Maren, 2012).

Uno de los modelos que ha intentado explicar los cambios sinápticos relacionados con el aprendizaje es el modelo Hebbiano de la plasticidad sináptica, el cual hace referencia a que la plasticidad puede ser inducida si un fuerte input presináptico produce actividad en la neurona postsináptica al mismo tiempo que otro input presináptico débil estimule a esa misma neurona postsináptica (Johansen et al., 2011). El resultado de este tipo de estimulación es que la sinapsis débil se fortalece, es decir, hace posible que estímulos débiles, que por sí mismos no serían capaces de provocar el fenómeno de la LTP, pueden ser potenciados a través de una asociación con estímulos fuertes. Dicha propiedad asociativa de la LTP es una analogía de la asociación que ocurre entre estímulos durante el condicionamiento clásico (Bliss y Collingridge, 1993; Johansen et al., 2011).

Los cambios celulares y moleculares inducidos por la convergencia de la información del EC y del EI en las células del núcleo La durante el condicionamiento del miedo (ver fig. 4), ha sido explicado utilizando el modelo hebbiano de la plasticidad sináptica. De acuerdo con esto, se ha propuesto que una fuerte depolarización de las neuronas del La evocada por un estímulo incondicionado aversivo da lugar al fortalecimiento de los inputs del estímulo condicionado actuando en las mismas neuronas. Esto resulta en el fortalecimiento de las sinapsis que procesan el EC, dotándolo de habilidad para activar ese núcleo eficazmente. De esta manera, cuando el EC se presenta solo, la activación del núcleo La, conduce a que la actividad neural se propague por la amígdala hasta el CeA y ocurran los consecuentes cambios fisiológicos y conductuales (Johansen et al., 2011).

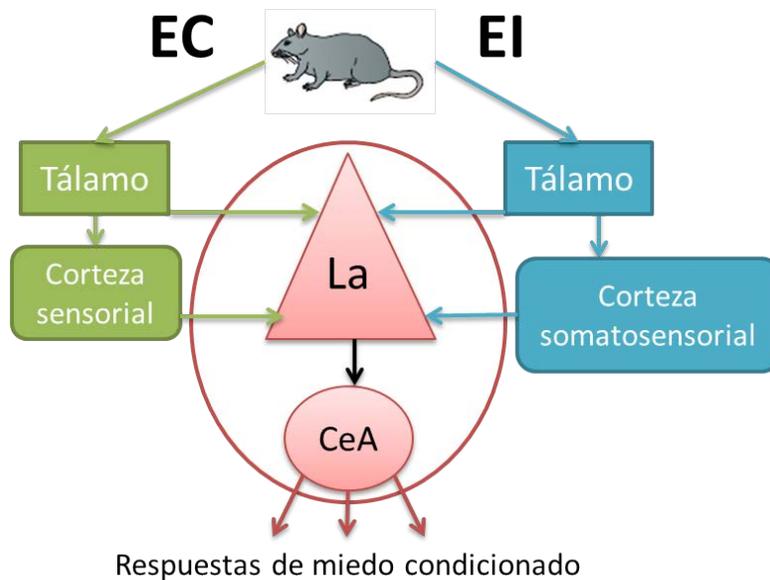


Fig. 4. Participación de la amígdala en el condicionamiento del miedo. Durante el condicionamiento del miedo, la información del estímulo condicionado (EC) y la del estímulo incondicionado (EI), convergen en el núcleo lateral (La) de la amígdala. Este circuito ha sido ampliamente descrito utilizando el modelo de la inmovilidad condicionada a un tono (adaptado de Medina et. al., 2002).

Como se mencionó anteriormente, la fase tardía de la LTP está involucrada en la remodelación de las sinapsis que subyace a la consolidación de un recuerdo aversivo. Dicho fenómeno es dependiente de síntesis de proteínas, las cuales participan estructuralmente para fortalecer la conexión sináptica en la vía neural involucrada (Johansen et al., 2011). Asimismo, la posterior evocación de un recuerdo de miedo induce síntesis de proteínas en la amígdala (Nader et al., 2000). Nader et al. (2000), demostraron que cuando se reactiva un recuerdo de miedo, este se encuentra en un estado lábil, en el cual, la infusión de anisomicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas, en el complejo BLA de la amígdala al poco tiempo de la evocación, produce amnesia en pruebas de memoria posteriores, sugiriendo que el proceso seguido a la evocación de un recuerdo, conocido como “reconsolidación”, requiere de la síntesis de proteínas en dicha estructura (Nader et al., 2000).

Durante el condicionamiento del miedo se activan una serie de cascadas moleculares que resultan en la síntesis de proteínas que hacen posible los cambios duraderos en las conexiones sinápticas y por lo tanto, la consolidación de dicho recuerdo. El proceso a través del cual ocurre lo anterior se describe a continuación.

El núcleo La recibe proyecciones glutamatérgicas de la corteza cerebral y del tálamo. El glutamato liberado se une a receptores tipo AMPA y NMDA en las membranas celulares en el La y se requiere de su activación dual para lograr que se generen efectos postsinápticos ligados a incrementos del calcio intracelular en esas neuronas. Dicho aumento de calcio induce la activación de proteínas como ERK1 y ERK2, las cuales ingresan al núcleo de la célula en donde activan el elemento de respuesta a la unión del AMPc (CREB), implicado en la transcripción de una gran variedad de genes, entre los cuales se encuentran los genes de expresión temprana (IEGs), como son *Fos*, *Arc/arg3.1* y *egr-1* (Schafe et al., 2001; Hall et al., 2001; Rodrigues et al., 2004; Johansen et al., 2011).

La activación de los IEGs regula la síntesis de proteínas que podrían participar en las modificaciones celulares que subyacen al aprendizaje y la formación de los recuerdos a largo plazo (Davis, 2003; Terleph y Tremere, 2006; Bermúdez- Rattoni, 2007; Ploski et al., 2010; Maddox et al., 2011). Se ha sugerido que los IEGs podrían tener una participación en la fase tardía de la LTP, puesto que este fenómeno es dependiente de la transcripción y traducción en las células, una etapa de la plasticidad que podría ser iniciada por los IEGs (Davis et al., 2003; Ploski et al., 2010).

Uno de los IEGs que se activan durante la adquisición y evocación de un recuerdo de miedo es el llamado gen de respuesta de crecimiento temprano-1 (“early growth response-1 gene”) mejor conocido como por sus siglas en inglés como *egr-1* (Ploski et al., 2010).

4.3 Descripción de EGR-1

El *egr-1*, también conocido como *zif268*, *krox 24*, *NGFI-A* y *tis 8*) pertenece a la familia *egr* (compuesta por los genes *egr-1*, *egr-2*, *egr-3* y *egr-4*) cuya característica principal es la presencia de tres de los llamados “dedos de zinc” (ver fig. 5), que muestran una gran afinidad por una secuencia específica del ADN (GCGGGGCG) presente en cientos de promotores expresados a lo largo del sistema nervioso central (Davis et al., 2003; Terleph y Tremere, 2006; Bermúdez-Rattoni, 2007).

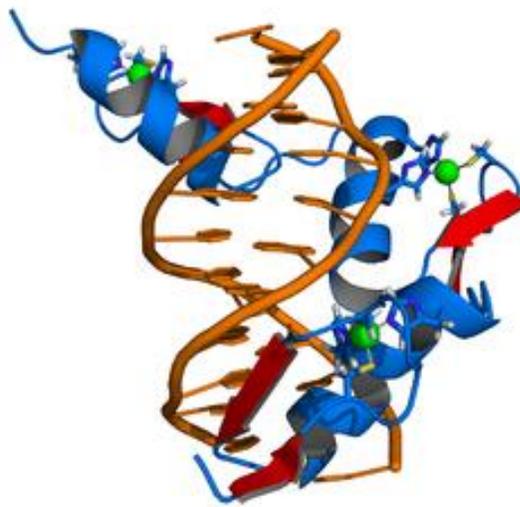


Fig. 5. Estructura de EGR-1. El zinc (de color verde) mantiene la estructura de las asas que constan de 30 aminoácidos cada una (de color azul), conocidas como “dedos de zinc”, los cuales interaccionan con el ADN (de color naranja).

El *egr-1* es altamente sensible a la depolarización de la membrana celular y puede ser activado por una gran variedad de estímulos entre los cuales se encuentran el estrés fisiológico, las convulsiones, el daño cerebral, causado por la hipoxia e isquemia, neurodegeneración, la apoptosis, así como la tolerancia y la dependencia inducida por drogas, entre otros; además puede ser inducido por una gran variedad de señales extracelulares, incluyendo neurotransmisores, péptidos y factores de crecimiento (Terleph y Tremere, 2006).

El *egr-1* codifica para una proteína de 88 o una de 82 KDa (dependiendo del sitio de iniciación de la actividad transcripcional del gen). En el cerebro de rata, la expresión del ARNm de *egr-1* (el cual corresponde con la ubicación de la proteína), se encuentra en neocorteza, cortezas olfatorias primaria y entorrinal, la amígdala, el núcleo accumbens, el estriado, la corteza cerebelar y el hipocampo (Davis et al., 2003). Los niveles más altos se observan entre los 90 minutos y las 2 horas, pero puede comenzar a detectarse desde los primeros 5 a 10 minutos después de la presentación de un estímulo aversivo, como un choque eléctrico en las patas de una rata (Terleph y Tremere, 2006; Rosen y Donley, 2006). Debido a que el EGR-1 se expresa rápidamente poco tiempo después de la estimulación, su expresión puede ser utilizada como indicador de actividad neuronal (Terleph y Tremere, 2006).

El EGR-1 regula la transcripción de genes involucrados en procesos relacionados con plasticidad en el cerebro, como sinapsinas I y II (Davis et al., 2003), los cuales codifican para unas proteínas asociadas a vesículas sinápticas involucradas en la regulación de la liberación de neurotransmisores y podrían estar involucradas en el proceso que da lugar a las modificaciones morfológicas y funcionales en las sinapsis (Bähler et. al., 1990).

4.3.1 Expresión de EGR-1 en la amígdala

La expresión del *egr-1* en la amígdala de ratas se ha examinado utilizando diferentes paradigmas conductuales. Uno de ellos es el “déficit del choque inmediato”, por medio del cual un grupo de ratas reciben un choque eléctrico en las patas tres minutos después de ser colocadas en la caja de condicionamiento, mientras que otro grupo de ratas es tratado de igual manera, con la única diferencia de que reciben el choque eléctrico inmediatamente al ser colocadas en el aparato; en consecuencia, la respuesta de inmovilidad en el grupo de ratas del choque demorado se condiciona al contexto debido a que aprenden a asociar este último con el choque eléctrico; por el contrario, la respuesta de inmovilidad de las ratas que reciben el choque inmediato no resulta condicionada al contexto. Así, Rosen et al. (1998), encontraron que, en contraste con grupos de ratas a las

que se les proporcionó un choque eléctrico inmediatamente al ser colocadas en la caja, las ratas que recibieron un choque eléctrico después de un periodo de aclimatación al aparato de tres minutos, tuvieron significativamente mayor tiempo de conducta de inmovilidad, así como mayor expresión del ARNm de *egr-1* en el núcleo La, al sacrificar a los animales 15 minutos después de la prueba conductual. Sin embargo, estos investigadores no encontraron cambios en la expresión del ARNm de *egr-1* después de la prueba de memoria realizada 24 horas después del condicionamiento (ver tabla 1). En línea con estos resultados, Malkani y Rosen (2000), encontraron un incremento en la expresión del ARNm de *egr-1* en el LaDL, al sacrificar a las ratas 30 minutos después de la sesión de condicionamiento y no después de la prueba de memoria (ver tabla 1). Con base en los resultados obtenidos, Rosen et al. (1998), y Malkani y Rosen (2000), sugirieron que la actividad transcripcional del *egr-1* en el LaDL juega un papel importante durante la adquisición del miedo al contexto, pero no durante su evocación.

Por otra parte, Hall et al., (2000), reportaron que el aumento que observaron en la expresión del ARNm de *egr-1* en el La no fue específicamente correlacionado con el proceso de adquisición de la inmovilidad condicionada al contexto (ver tabla 1), sin embargo, en un estudio posterior, Hall et al. (2001b), dicha expresión se incrementó en las neuronas de los núcleos La, BLA y CeA de la amígdala al sacrificar a las ratas 30 minutos después de la prueba de la memoria del recuerdo de miedo condicionado al contexto y a un tono (EC), realizada tres días a partir del condicionamiento (ver tabla 1).

Por último, Maddox et al. (2011), encontraron un aumento en la expresión de la proteína EGR-1 en la porción dorsal y ventral del núcleo La de la amígdala y también, aunque en menor proporción, en los núcleos BLA y CeA después del condicionamiento a un tono y a una prueba de memoria realizada a las 24 horas (ver tabla 1), apoyando la posibilidad de que el EGR-1 participe tanto en la consolidación como en la reconsolidación de la memoria (Maddox et al., 2011). Como puede observarse en la tabla 1, la proteína EGR-1, o el RNA a partir del

cual se traduce, han sido implicados en el proceso de adquisición, consolidación o incluso reconsolidación (Maddox et al., 2011), utilizando diferentes paradigmas conductuales para el condicionamiento y la evocación del recuerdo de miedo.

Tabla 1. Expresión de EGR-1 en los núcleos La, BLA y CeA durante la adquisición y la evocación con diferentes modelos de condicionamiento aversivo		
Núcleo	Adquisición	Evocación
Lateral	↑ Rosen et al., (1998)* ↑ Malkani y Rosen, (2000)* -- Hall et al., (2000)* ↑ Maddox et al., (2011)+	-- Rosen et al., (1998) -- Malkani y Rosen, (2000) ↑ Hall et al., (2001b)*+ ↑ Maddox et al., (2011)
Basolateral	-- Rosen et al., (1998) -- Malkani y Rosen, (2000) ↑ Maddox et al., (2011)	-- Rosen et al., (1998) -- Malkani y Rosen, (2000) ↑ Hall et al., (2001b) ↑ Maddox et al., (2011)
Central	-- Rosen et al., (1998) -- Malkani y Rosen, (2000) ↑ Maddox et al., (2011)	-- Rosen et al., (1998) -- Malkani y Rosen, (2000) ↑ Hall et al., (2001b) ↑ Maddox et al., (2011)
↑ Aumento en la expresión de la proteína EGR- 1 -- No hubo diferencias significativas * Inmovilidad condicionada al contexto. + Inmovilidad condicionada a un sonido.		

En apoyo a lo anterior, la administración bilateral de un oligonucleótido anti sentido para *egr-1* dentro de los núcleos La y BLA previo al condicionamiento previene tanto la adquisición del miedo al contexto medido en la prueba del congelamiento condicionado, como la memoria a largo plazo del miedo evaluada 24 horas después del condicionamiento (Malkani et al., 2004). Asimismo, ha sido observado que en animales knockout (KO), en los que se ha suprimido la expresión de *egr-1* desde el nacimiento, existen déficits en la consolidación del recuerdo de miedo condicionado a un tono (“cue”), cuando este es evocado 3 días a partir de su condicionamiento, pero no al contexto ni cuando este sigue al condicionamiento a un trazo (“trace conditioning”), en el que el estímulo incondicionado se presenta tiempo después del estímulo condicionado (Ko et al., 2005).

Capítulo 5

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVO E HIPÓTESIS

5.1 Planteamiento del problema

Se ha reportado que durante la adquisición y/o evocación de conductas defensivas condicionadas se activan genes de expresión temprana, entre ellos, el *egr-1*, el cual codifica para el factor de transcripción EGR-1 que podría estar participando en estos procesos.

Debido a que en todas las investigaciones realizadas para estudiar el papel del *egr-1* en la amígdala durante la adquisición y la evocación del miedo condicionado, se ha utilizado solamente el modelo de inmovilidad condicionada, consideramos que sería importante estudiar la expresión de la proteína EGR-1 en la amígdala de rata bajo un paradigma conductual distinto, como lo es el enterramiento defensivo condicionado. La relevancia de utilizar esta prueba radica en que permite condicionar rápidamente la conducta de enterramiento defensivo, la cual forma parte del repertorio conductual etológico de los roedores.

Por consiguiente, con este trabajo se espera identificar la expresión de la proteína EGR-1 en la amígdala durante la adquisición y la evocación del recuerdo de miedo empleando la prueba de enterramiento defensivo condicionado y con base en los antecedentes sobre la expresión de EGR-1 en los núcleos La, BLA y CeA de la amígdala en el condicionamiento aversivo, en este trabajo se estudiará la expresión de esta proteína en tales núcleos.

5.2 Pregunta de investigación

¿Existen cambios en la expresión de la proteína EGR-1 en los núcleos amigdalinos La, BLA y CeA tras la adquisición y la evocación del recuerdo de miedo por medio de la prueba de enterramiento defensivo condicionado?

5.3 Objetivo

Determinar el patrón de expresión de EGR-1 en los núcleos La, BLA y CeA de la amígdala de rata, 90 minutos después de la adquisición y la evocación del recuerdo de miedo en la prueba de enterramiento defensivo condicionado.

5.3.1 Objetivos específicos

1. Estudiar la expresión de EGR-1 en los núcleos La, BLA y CeA de la amígdala tras la *adquisición* en la prueba de enterramiento defensivo condicionado.
2. Estudiar la expresión de EGR-1 en los núcleos La, BLA y CeA de la amígdala tras la *evocación* en la prueba de enterramiento defensivo condicionado.

5.4 Hipótesis

La expresión de EGR-1 en los núcleos La, BLA, y CeA de la amígdala es diferente entre ellos y, además, entre las fases de adquisición y de evocación del recuerdo de miedo en la prueba de enterramiento defensivo condicionado.

Capítulo 6

MÉTODO

6.1 Diseño de investigación

Tipo de diseño

El diseño fue de tipo experimental con dos grupos controles y dos experimentales. Las ratas fueron asignadas aleatoriamente a cada uno de los grupos.

Diseño estadístico

Tanto para los datos conductuales como para los estereológicos se utilizó un diseño de grupos independientes.

6.2 Sujetos

Se emplearon 40 ratas macho de la cepa Wistar (240 ± 5 g) obtenidas del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se alojó a las ratas en cajas individuales con libre acceso a comida y agua.

6.3 Escenario

Los experimentos se realizaron en el laboratorio AL-204 del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. El cuarto donde se alojaron las ratas se mantuvo bajo condiciones ambientales controladas de temperatura ($20-25$ °C), humedad (45-55 %) y luminosidad, utilizando un ciclo luz-obscuridad de 12:12 horas, con las luces prendidas de 8 am a 8 pm. Durante la realización de la prueba conductual, el cuarto estuvo iluminado con luz roja a una intensidad de 2.3 luxes.

6.4 Equipo y material

Prueba conductual: caja de acrílico transparente (27x14x23 cm), con una cama de aserrín de 5 centímetros de grosor, electrodo de 7 centímetros de largo y 0.5 centímetros de diámetro (ver fig. 6), foco rojo, fuente eléctrica fabricada por Lafayette Instruments Inc. y sistema de videograbación.

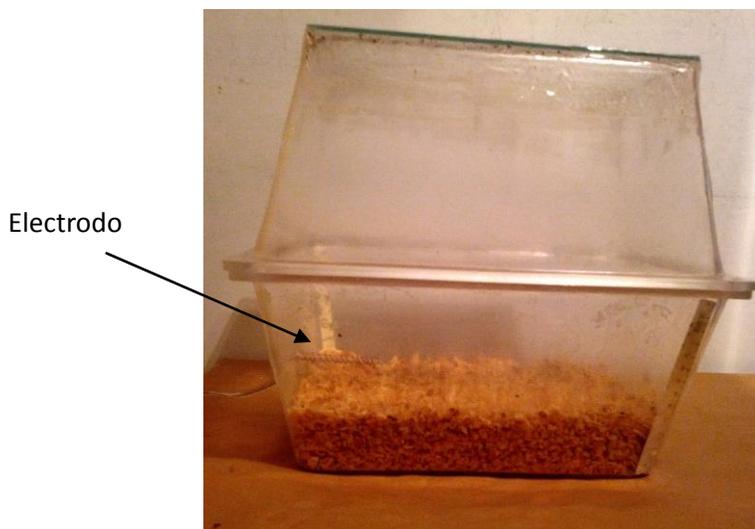


Fig. 6. Caja para el enterramiento defensivo condicionado. Sus paredes son de acrílico transparente de 27x14x23 cm. El piso está cubierto por una cama de aserrín de 5 centímetros de altura. En la pared del lado izquierdo está insertado un electrodo de 7 centímetros de largo y 0.5 centímetros de diámetro.

Fijación y conservación del cerebro: bomba de perfusión, tijeras, pinzas, solución salina fisiológica, paraformaldehído al 4%, sacarosa al 10, 20 y 30%.

Técnica inmunohistoquímica: criostato, micropipetas, gancho de vidrio, tubos eppendorf, filtros, cristalizadores, cajas de petri, pinceles, portaobjetos, cubreobjetos, phosphate- buffered saline (PBS por sus siglas en inglés) 0.1M pH 7.2, PBS-GT (suero de cabra al 1% y tritón x100 al 10%), anticuerpo primario anti-EGR-1 (Santa Cruz Biothecnology, policlonal de conejo, Catálogo #SC110), Kit ABC Vectastain rabbit igG, (IgG antirabbit biotinilado, avidina, biotina), Trizma pre-set pH 7.2, 0.05 M, diaminobenzidina, H₂O₂ al 30%

Para poder observar el tejido al microscopio se utilizó: solución de montaje, H₂O desionizada, alcohol al 70, 96 y 100%, xilol, permount, laminillas y cubreobjetos.

Estereología: Microscopio BX51 Olympus y programa Image-Pro Plus 6.

6.5 Procedimiento

6.5.1 Prueba de enterramiento defensivo condicionado

Los experimentos se llevaron a cabo cada día a partir de las 10 am a las 4 pm aproximadamente. Las ratas fueron colocadas en una caja de condicionamiento con una cama de aserrín de cinco centímetros de altura durante 10 minutos por cuatro días consecutivos, en un cuarto bajo condiciones ambientales controladas de temperatura, humedad y luminosidad señaladas anteriormente. Al quinto día, las ratas se asignaron aleatoriamente a los grupos experimentales, denominados “Adquisición” y “Evocación” o a los grupos controles, nombrados como “Control adquisición” y “Control evocación”. Únicamente las ratas de los grupos “Adquisición y Evocación” pasaron por la fase de condicionamiento. Al sexto día, solamente a las ratas de los grupos “Evocación” y “Control evocación” se les realizó una prueba de memoria 24 horas después del condicionamiento (ver fig. 7). Cada una de estas fases consistió en lo siguiente:

Condicionamiento

Se colocó a las ratas por 10 minutos en la caja con un electrodo conectado a una fuente de corriente eléctrica calibrada para dar descargas de 0.5 mA de intensidad. La conducta fue videograbada y analizada posteriormente.

Prueba de memoria

Las ratas fueron introducidas nuevamente por 10 minutos al aparato con el electrodo sin corriente eléctrica. Como en el caso anterior, la conducta de la rata fue videograbada en forma remota y analizada con posterioridad.

A continuación se describe la manipulación que se dio a cada uno de los grupos:

Grupo “Adquisición”- Se introdujo la rata a la caja con el electrodo electrificado y después de 10 minutos la rata fue transferida a su caja hogar en donde permaneció 90 minutos hasta que fue sacrificada y perfundida (n=8).

Grupo “Control adquisición”- Se introdujo a la rata en la caja con el electrodo sin corriente eléctrica y después de 10 minutos la rata fue transferida a su caja hogar en donde permaneció 90 minutos hasta que fue sacrificada y perfundida (n=6).

Grupo “Evocación”- Se introdujo la rata al aparato con el electrodo electrificado y después de 10 minutos la rata fue transferida a su caja hogar. Al día siguiente de la sesión de condicionamiento se colocó la rata por 10 minutos en la caja, pero en esta ocasión con el electrodo sin corriente eléctrica. Al finalizar la prueba, la rata fue transferida a su caja hogar donde permaneció 90 minutos hasta el momento en que fue sacrificada y perfundida (n=7).

Grupo “Control evocación”- Se introdujo a la rata en la caja con el electrodo sin corriente eléctrica y después de 10 minutos la rata fue transferida a su caja hogar. Al día siguiente, se colocó nuevamente a la rata en la caja con el electrodo sin corriente eléctrica. Al finalizar la prueba, la rata fue transferida a su caja hogar donde permaneció 90 minutos hasta el momento en que fue sacrificada y perfundida (n=5).

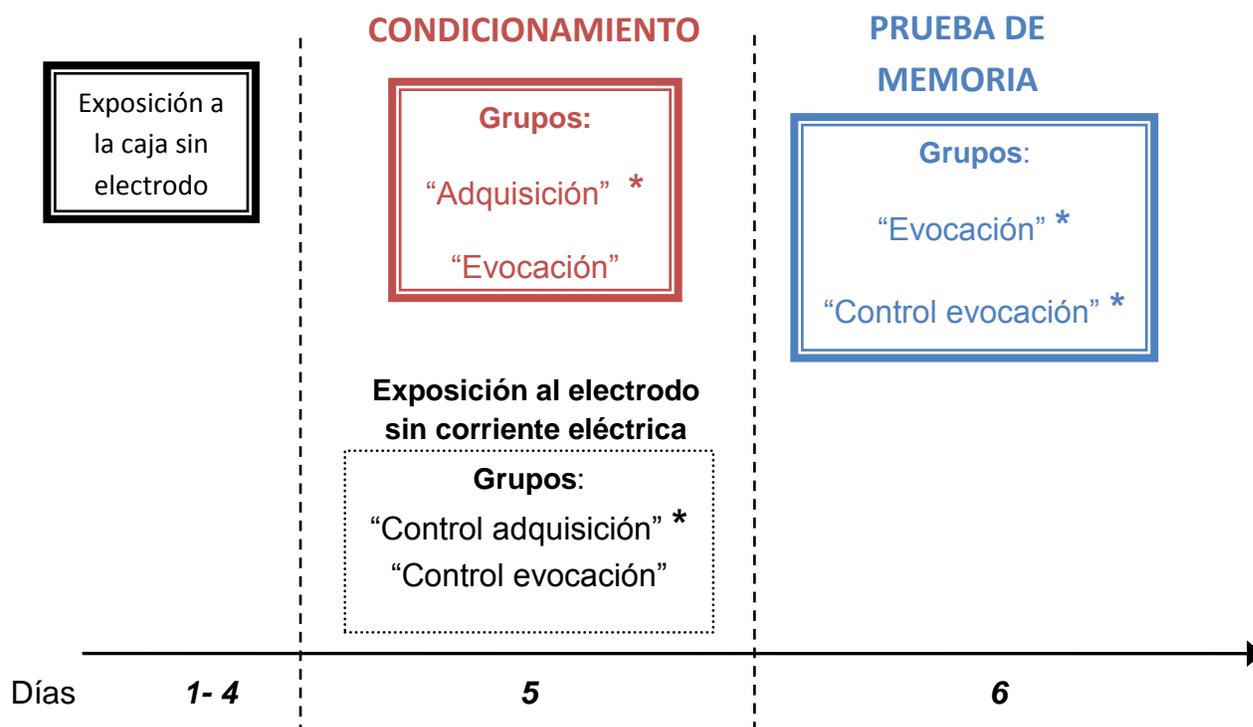


Fig. 7. Todas las ratas fueron colocadas en el aparato sin electrodo por cuatro días. Al quinto día se formaron cuatro grupos, dos de ellos, "Adquisición" y "Evocación" fueron sometidos al condicionamiento; mientras que los otros dos grupos, "Control adquisición" y "Control evocación" solamente fueron expuestos al aparato con el electrodo sin corriente eléctrica. Por último, en el sexto día, se realizó la prueba de memoria a las ratas de los grupos "Evocación" y "Control evocación". *: Perfusión 90 minutos después de la prueba conductual.

Variables conductuales

Los parámetros conductuales que se utilizaron en este trabajo para evaluar la conducta de las ratas durante la prueba conductual fueron los siguientes:

- *Número de episodios de enterramiento.* Número de ocasiones en que la rata inicia la conducta de enterramiento y la mantiene continuamente hasta que deja de enterrar.
- *Tiempo de enterramiento.* Total de segundos que la rata dedica a arrojar aserrín con sus patas delanteras hacia el electrodo.
- *Aproximaciones al electrodo.* Número de veces que la rata se acercó a explorar el electrodo sin hacer contacto físico con este.

Fijación del cerebro

Al final de la manipulación experimental, cada una de las ratas fue anestesiada profundamente con pentobarbital sódico (~60.0 mg/kg) y perfundida a través del sistema vascular con solución salina 0.9% (1 mL por Kg) y después paraformaldeído al 4% (1mL por Kg).

Posteriormente se retiró el cerebro y se mantuvo en una solución de paraformaldehído al 4% y en soluciones sucesivas de sacarosa al 10, 20 y 30% a 4°C por 24 horas en cada una de ellas.

Obtención de secciones de cerebro

Tras la fijación de los cerebros, cada uno de ellos fue rebanado en cortes coronales con un criostato a un temperatura de entre -18 a -22 °C. Los cortes tuvieron un grosor de 40 micrómetros y fueron obtenidos entre las coordenadas aproximadamente de -2.12 a -3.30 a partir del Bregma, de acuerdo a Paxinos y Watson (1986) y se recogieron de manera seriada en cinco pozos que contenían solución de PBS.

6.5.2 Técnica inmunohistoquímica

La técnica que se utilizó para marcar las neuronas que expresaron EGR- 1 fue la inmunohistoquímica. Para conocer qué concentración del anticuerpo primario anti EGR-1 era la más conveniente a utilizar, se llevó a cabo una curva de titulación, que consistió en diluir en anticuerpo primario en PBS a 1:500, 1:1000,

1:2000 y 1:4000 y se llevó a cabo la técnica como se indica abajo. Finalmente, se decidió que la dilución más conveniente a utilizar fue la de 1:1000.

El marcaje inmunohistoquímico del EGR-1 se realizó de acuerdo a lo señalado a continuación utilizando las rebanadas contenidas solamente en uno de los pozos.

1. Los cortes obtenidos de cada cerebro fueron incubados con el anticuerpo primario, anti EGR-1 (Santa Cruz Biothecnology, policlonal de conejo, Catálogo #SC110) diluido 1:1000 con PBS-GT a 4 °C, en agitación suave y continua durante 72 horas.
2. La reacción antígeno-anticuerpo fue interrumpida por la realización de tres lavados en PBS de 10 minutos cada uno.
3. Las secciones fueron posteriormente incubadas con IgG anti-conejo biotinilado diluido 1:200 con PBSGT bajo agitación suave y continua por dos horas a temperatura ambiente.
4. Como en el caso anterior esta nueva reacción antígeno anticuerpo fue interrumpida por tres lavados en PBS de 10 minutos cada uno.
5. Para la detección del anti-anticuerpo se colocaron en cada tubo 9 µl de avidina y 9 µl de biotina, utilizando puntas diferentes para evitar su mezcla. Se centrifugó y se dejó reposar por dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente dicha mezcla se diluyó con 982 µl de PBS-GT y en ella se incubaron los cortes en agitación suave y continua por dos horas a temperatura ambiente.
6. Se realizaron tres lavados en PBS de 10 minutos cada uno.
7. Posteriormente los cortes se incubaron por cinco minutos en una solución de Trizma (pH 7.2) conteniendo una pizca de diaminobenzidina (sustrato de la peroxidasa).
8. Se agregaron 70 µl de H₂O₂ para detectar el producto de la reacción de la diaminobenzidina con la peroxidasa y se retiraron los cortes después de 10 a 15 minutos.

9. Tras el lavado de los cortes en tres ocasiones con PBS, (10 minutos cada uno) estos fueron montados en portaobjetos usando solución de montaje, siguiendo un orden antero-posterior.
10. Finalmente, los cortes fueron deshidratados en soluciones de concentración creciente de etanol (70-100%), aclaradas con xilol y montadas en portaobjetos.

6.5.3 Estereología

Para llevar a cabo una estimación del número de neuronas que expresaron EGR-1, se creó una rejilla con 17 x 12 cuadros de 40 x 40 μm c/u, con ayuda del programa Image-Pro Plus y con una gradilla de calibración de un milímetro conteniendo divisiones cada 10 μm . La rejilla fue colocada sobre las fotografías tomadas a un aumento (10X), de las regiones amigdalinas de interés y se contabilizaron aquellos núcleos neuronales marcados por medio de la inmunohistoquímica, que estuvieran dentro o tocaran los límites de los cuadros de la rejilla. Ver fig. 8.

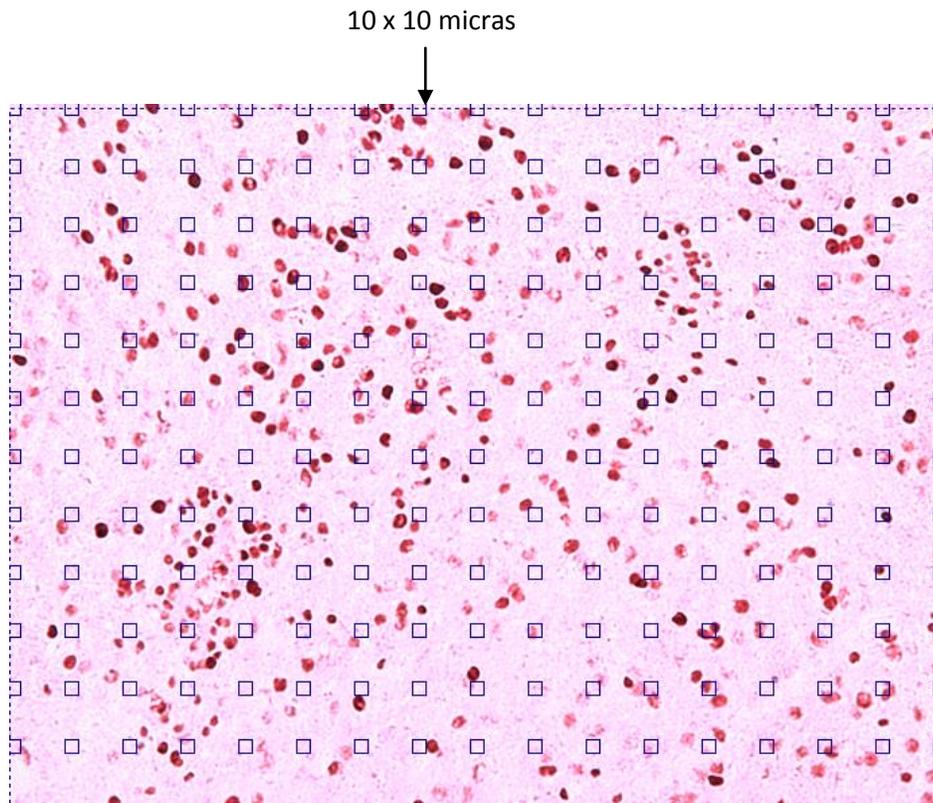


Fig. 8. Rejilla de muestreo. A cada fotografía (10X) se le colocó encima esta rejilla para llevar a cabo el muestreo. Cada cuadro azul mide 10 x 10 μm .

Por último, se empleó la técnica del fraccionador óptico para llevar a cabo la estimación del número total de neuronas que expresaron EGR-1 en los núcleos La, BLA y CeA, basada en la siguiente ecuación (Howard y Reed, 1998):

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

En donde:

N : es la estimación del número total de neuronas.

Q : es el número de neuronas contadas en un cerebro (de amígdala izquierda y derecha).

hsf (*height sampling fraction por sus siglas en inglés*): se refiere a la altura (*h*) del disector en relación al grosor de las secciones (*T*). Se obtiene a partir de:

$$hsf = \frac{h}{T}$$

asf (*area sampling fraction, por sus siglas en inglés*): es la fracción del área muestreada. Se obtiene a partir de:

$$asf = \frac{a/f}{\Delta x \cdot \Delta y}$$

En donde:

a/f: es el área de conteo.

$\Delta x \cdot \Delta y$: es el área asociada con cada movimiento en los ejes de *x,y*, la cual contiene el área de conteo.

ssf (*slice sampling fraction, por sus siglas en inglés*): se refiere a la fracción de muestreo de las secciones tomados para el análisis.

Al sustituir los valores reales empleados para el conteo, la ecuación queda de la siguiente manera:

$$hsf = \frac{1}{1}$$

$$ssf = \frac{1}{5}$$

$$asf = \frac{100 \mu^2}{1600 \mu^2} = \frac{1 \mu^2}{16 \mu^2}$$

Por lo tanto:

$$= Q \cdot \frac{1}{1} \cdot \frac{1}{16} \cdot \frac{1}{5}$$

Es decir,

$$= Q . 1 . 16 . 5$$

6.6 Análisis de datos

Para el análisis de los resultados conductuales, se realizaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Levene a los datos del número de episodios de enterramiento, tiempo de enterramiento y número de aproximaciones. Posteriormente, se practicó la prueba T de Student para comparar el número de episodios y tiempo de enterramiento entre los grupos “Adquisición” y “Evocación”. Por otra parte, para el análisis del número de aproximaciones, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, Fase (adquisición y evocación) x Grupo (control y experimental).

Para poder llevar a cabo la estereología, se utilizaron seis cortes coronales por cada cerebro, que como se mencionó anteriormente, se localizaron entre las coordenadas de -2.12 a -3.30 milímetros a partir del bregma, de acuerdo al Atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1986). Se tomaron fotografías (10X) de los núcleos a cada una de las cuales se puso encima la rejilla de muestreo para llevar a cabo el conteo y sustituir los valores correspondientes en la ecuación de la técnica del fraccionador óptico. Finalmente, el análisis de los resultados obtenidos se llevó a cabo mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, seguidas de la prueba de ANOVA de dos vías, Fase (adquisición y evocación) x Grupo (control y experimental), para comparar la expresión de la proteína EGR-1 en los núcleos amigdalinos.

Los resultados tanto conductuales como de la estereología, se analizaron considerando el nivel de significancia de 0.05.

El análisis de datos se llevó a cabo mediante el programa de análisis estadístico SPSS 15.0.

Capítulo 7

RESULTADOS

7.1 Análisis conductual

Frecuencia de episodios de enterramiento y tiempo de enterramiento

Como se esperaba, las ratas pertenecientes a los grupos “Control adquisición” y “Control evocación” no presentaron la conducta de enterramiento, debido a que no recibieron descargas eléctricas por parte del electrodo. En contraste, las ratas de los grupos “Adquisición” y “Evocación” mostraron esta conducta (ver figuras 9 y 10) y, por lo tanto, se llevó a cabo un análisis para comparar ambos grupos, el cual se describe a continuación.

De acuerdo a la prueba de Kolmogorov-Smirnov, los grupos “Adquisición” y “Evocación”, tuvieron una distribución normal en el tiempo total de enterramiento y el número de episodios de enterramiento. Asimismo, la prueba de Levene practicada mostró que hubo homogeneidad de varianzas entre dichos grupos, sobre el número de episodios de enterramiento y el tiempo de enterramiento.

Posteriormente, la prueba T de Student no reveló diferencias significativas entre los grupos “Adquisición” y “Evocación”, respecto al número de episodios y tampoco sobre el tiempo de enterramiento.

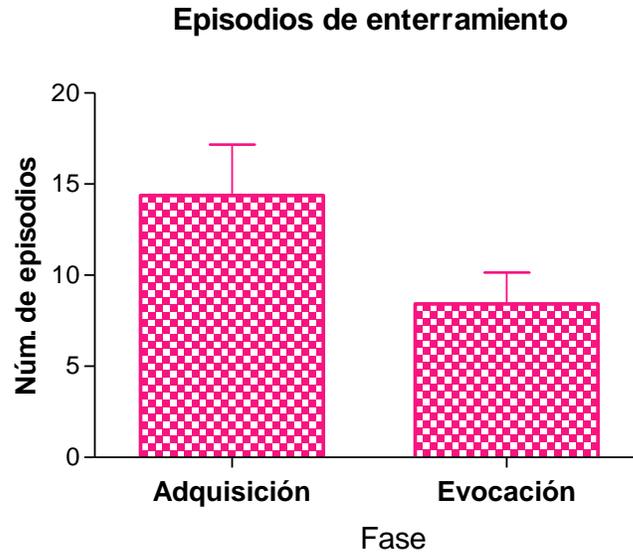


Fig. 9. Episodios de enterramiento. Se muestra la media con su respectivo error estándar del número de episodios de enterramiento. Obsérvese que no hubo diferencia significativa entre los grupos “Adquisición” y “Evocación” (Prueba T de Student); $n=8, 7$.

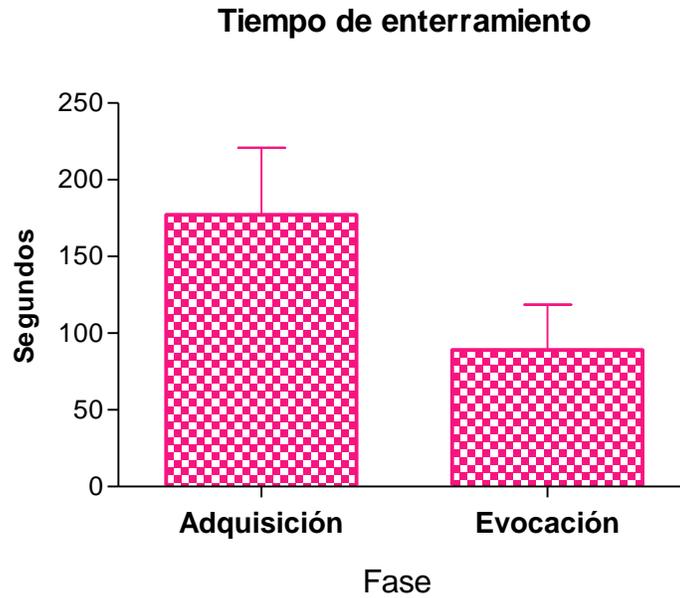


Fig. 10. Tiempo de enterramiento. Se muestra la media con su respectivo error estándar del tiempo de enterramiento. Obsérvese que no hubo diferencia significativa entre los grupos “Adquisición” y “Evocación” (Prueba T de Student); $n=8, 7$.

Aproximaciones al electrodo

Independientemente de que el electrodo estuviera electrificado o no, todas las ratas se acercaron a éste como parte de la exploración de la caja. Por lo tanto, se llevó a cabo el siguiente análisis estadístico para comparar esta conducta entre todos los grupos.

De acuerdo a la prueba de Kolmogorov-Smirnov, el número de aproximaciones al electrodo tuvo una distribución normal. Asimismo, la prueba de Levene mostró que hubo homogeneidad de varianzas entre los grupos. A continuación, el ANOVA de dos vías Fase x Grupo, reveló un efecto significativo solamente debido al grupo ($F_{(1,22)}=10.77$, $P=0.003$), ya que no se encontró efecto de la fase, ni de la interacción entre estos dos factores. Ver fig. 11.

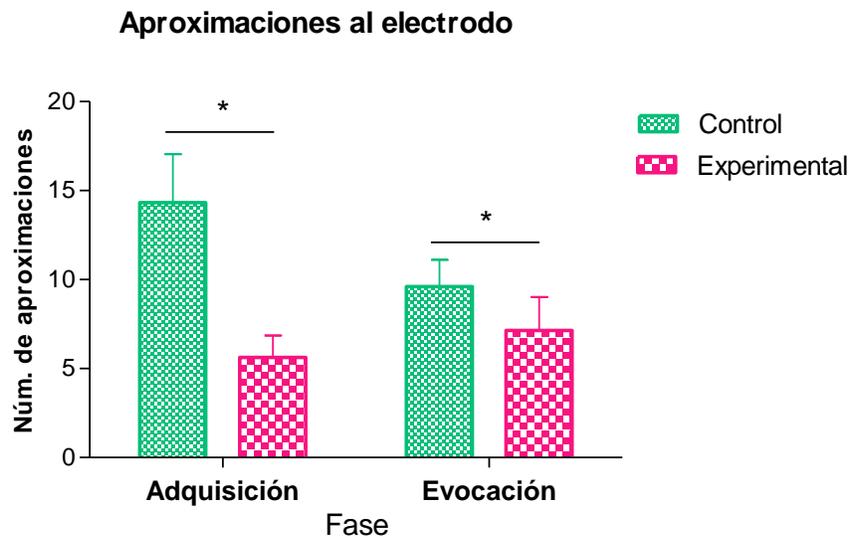


Fig. 11. Aproximaciones al electrodo. Se muestra la media con su respectivo error estándar del número total de aproximaciones al electrodo. Obsérvese que hubo diferencias entre los grupos “Control Adquisición” y “Adquisición” y entre los grupos “Control Evocación” y “Evocación” (ANOVA de dos vías Fase x Grupo); $n=6, 8, 5$ y 7 . * $P<0.05$.

7.2 Expresión de la proteína EGR-1 en la amígdala

En la fig. 12 se muestran los contornos de los núcleos La, CeA y BLA de cortes coronales a nivel -2.56 milímetros a partir del Bregma, de acuerdo al Atlas de Paxinos y Watson (1986), de cada uno de los grupos utilizados.

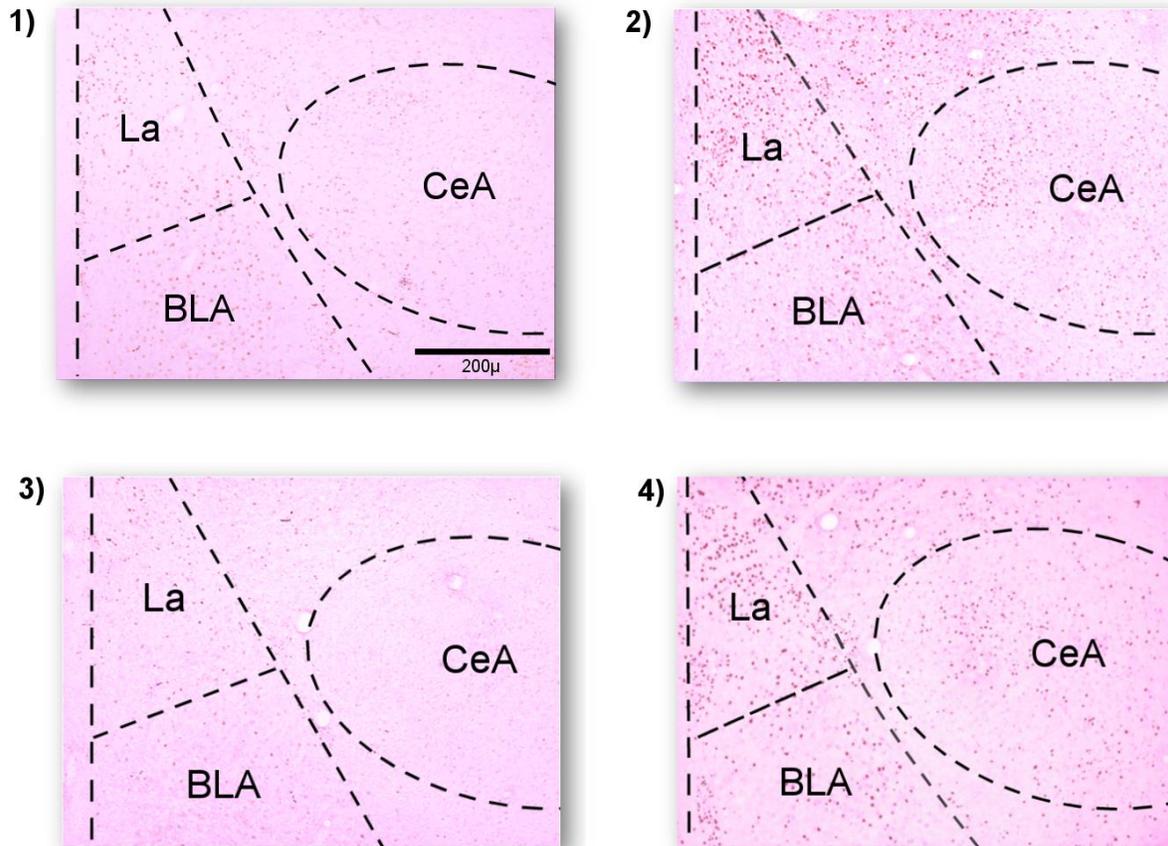


Fig. 12. Contornos de los núcleos La, BLA y CeA en secciones coronales correspondientes al nivel -2.56 milímetros aproximadamente a partir del Bregma según el Atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1986). Las fotografías fueron tomadas con un aumento 4X. La: núcleo lateral; BLA: núcleo basolateral; CeA: núcleo central. Grupos: 1) “Control adquisición”, 2) “Adquisición”, 3) “Control evocación” y 4) “Evocación”.

En la fig. 13 se muestra la expresión de EGR-1 en los núcleos La, BLA y CeA. Obsérvese que tanto durante la adquisición como en la evocación de la conducta de miedo condicionado, existe un marcado incremento en el número de

núcleos inmunomarcados para EGR-1, en los núcleos La, BLA y CeA, en los grupos experimentales en comparación a sus respectivos grupos controles.

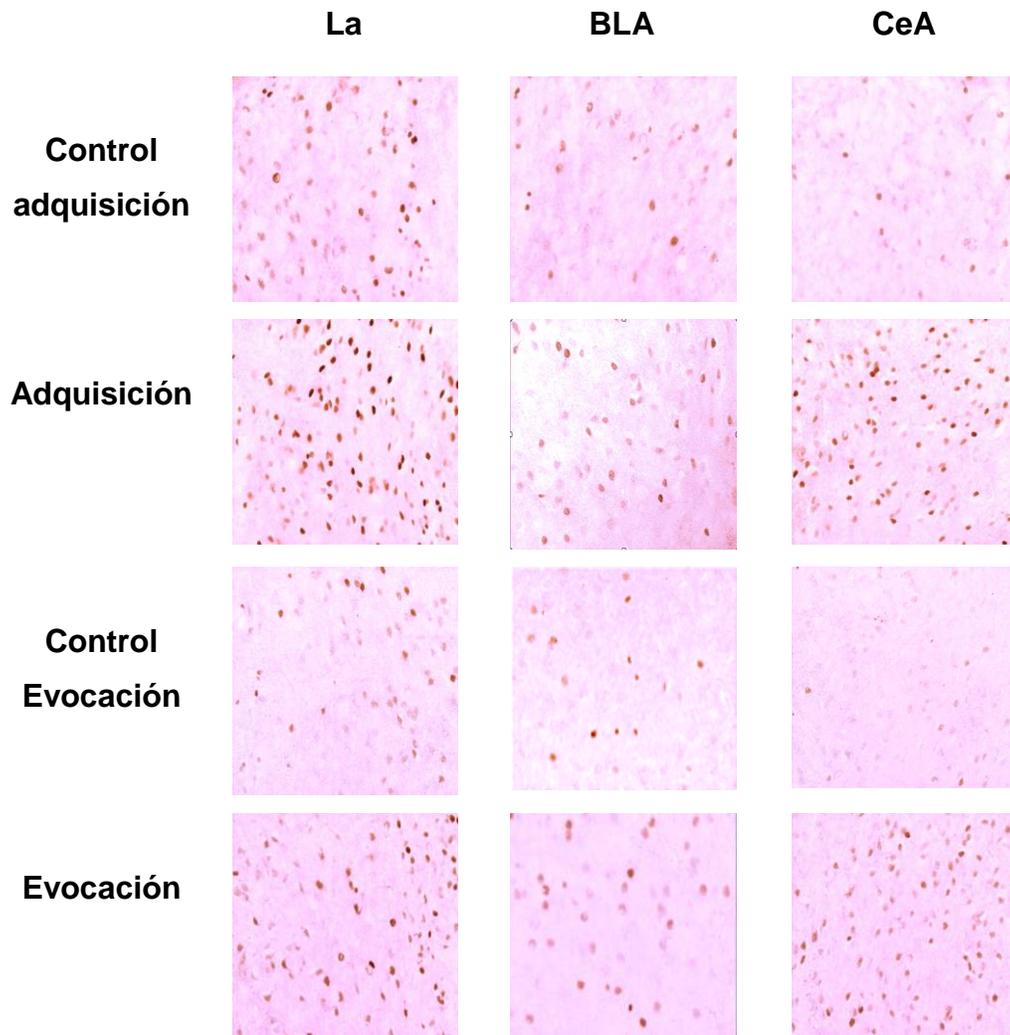


Fig. 13. Inmunoreactividad para EGR- 1 en los núcleos La, BLA y CeA en la prueba de enterramiento defensivo condicionado. Obsérvese que tanto en la adquisición como en la evocación de la conducta, hubo un marcado incremento en el número de núcleos celulares inmunoreactivos dentro del La, BLA y CeA, en los grupos experimentales en comparación a sus grupos controles. Las fotografías fueron tomadas a un aumento de 20X en secciones coronales correspondientes al nivel -2.56 milímetros aproximadamente a partir del Bregma, de acuerdo al Atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1986).

A continuación se muestran los resultados del análisis estadístico sobre la expresión de la proteína EGR-1 en cada núcleo estudiado.

Núcleo lateral

La expresión de EGR-1 en este núcleo se muestra en la fig. 14. De acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, los datos tuvieron una distribución normal. Asimismo, la prueba de Levene mostró que hubo homogeneidad de varianzas entre los grupos. Posteriormente, el ANOVA de dos vías practicado de Fase x Grupo reveló un efecto significativo debido al grupo ($F_{(1,20)}=22.858$, $P=0.0001$). Sin embargo, no se encontró efecto de la fase ni de la interacción entre estos factores.

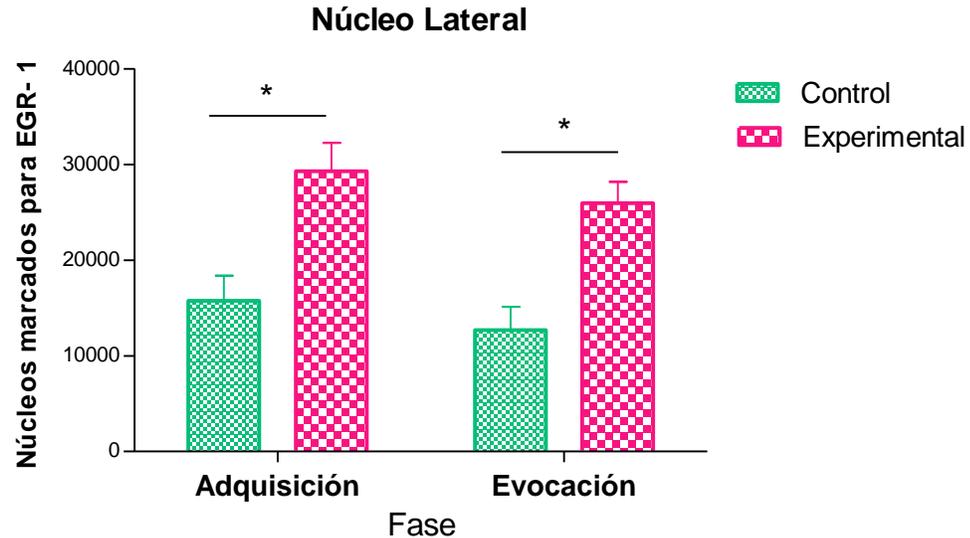


Fig. 14. Expresión de EGR-1 en el núcleo La. Se indica la media con su respectivo error estándar. Obsérvese que hubo una mayor expresión de la proteína cuando los grupos experimentales fueron comparados con su respectivo grupo control (ANOVA de dos vías Fase x Grupo); $n=6, 8, 5$ y 7 . $*P<0.05$.

Núcleo BLA

La expresión de la proteína EGR-1 dentro del BLA se muestra en la fig. 15. De acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, los datos tuvieron una distribución normal y la prueba de Levene mostró que hubo homogeneidad entre las varianzas. A continuación, el ANOVA de dos vías practicado de Fase x Grupo reveló que hubo un efecto significativo debido al grupo ($F_{(1,20)}=9.032$, $P=0.006$) pero no así por la fase ni de la interacción entre los factores.

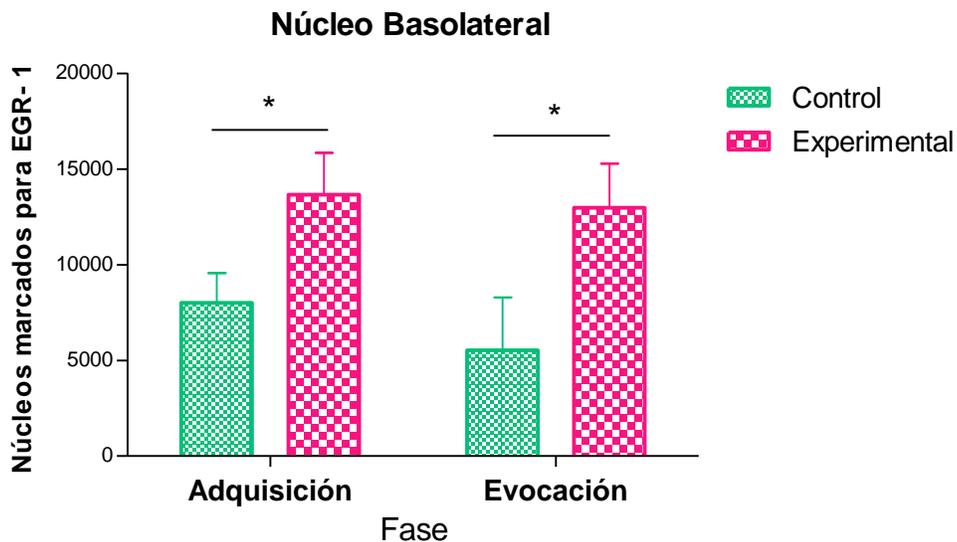


Fig. 15. Expresión de EGR-1 en el núcleo BLA. Se indica la media con su respectivo error estándar. Obsérvese que hubo una mayor expresión de la proteína cuando los grupos experimentales “Adquisición” y “Evocación” fueron comparados con su respectivo grupo control (ANOVA de dos vías Fase x Grupo); $n=6, 8, 5$ y 7 . $*P<0.05$.

Núcleo CeA

La expresión de EGR-1 en el núcleo CeA se muestra en la fig. 16. Con base en lo obtenido en la prueba de Kolmogorov-Smirnov, los datos tuvieron una distribución normal. Asimismo, la prueba de Levene mostró que hubo homogeneidad de varianzas entre los grupos. Posteriormente, el ANOVA de dos vías Fase x Grupo mostró efectos significativos debidos al grupo ($F_{(1,20)}=21.354$, $P=0.0001$). Sin embargo, no se encontraron efectos debidos a la fase ni a la interacción entre los factores.

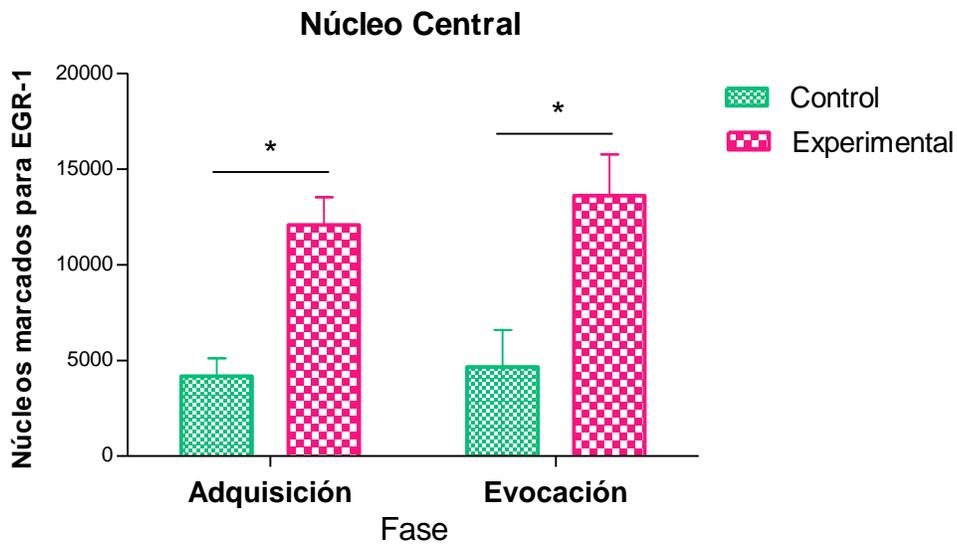


Fig. 16. Expresión de EGR-1 en el núcleo CeA. Los resultados se expresan como medias con su respectivo error estándar. Obsérvese que hubo una mayor expresión de la proteína en los grupos experimentales en comparación a su respectivo grupo control (ANOVA de dos vías Fase x Grupo); $n=6, 8, 5$ y 7 .
* $P<0.05$.

Capítulo 8

DISCUSIÓN

8.1 Prueba de enterramiento defensivo condicionado

Durante esta prueba, la conducta de enterramiento se observó en los animales tanto en la fase de adquisición como en la de evocación, a diferencia de lo que ocurrió en los animales de los grupos controles, que no estuvieron en presencia del electrodo electrificado. El enterramiento del electrodo durante la primera fase de la prueba tuvo un carácter defensivo, además, las ratas aprendieron a asociar el electrodo con la ocurrencia de las descargas eléctricas (Terlecki et al., 1979); mientras que en la fase de evocación, ocurrió el enterramiento tan sólo en presencia del electrodo sin corriente eléctrica, indicando que tales animales fueron condicionados al electrodo (“cue”). Cabe destacar que el condicionamiento de la conducta de enterramiento observado en este trabajo se manifestó tanto en el número de episodios de enterramiento como en el tiempo de su ocurrencia, pues no se encontraron diferencias significativas entre los grupos “Adquisición” y “Evocación”. En línea con lo anterior, hubo mayor número de aproximaciones al electrodo por parte de los grupos experimentales en comparación a los grupos controles, sin embargo, tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos “Adquisición” y “Evocación”, lo cual podría estar manifestando indirectamente la evitación pasiva por parte de las ratas hacia el objeto que les generó aversión, es decir, el electrodo.

Cuando un sujeto aprende a asociar la ocurrencia de estímulos en el ambiente con consecuencias dañinas para él, en su cerebro comienzan a llevarse a cabo mecanismos celulares y moleculares que hacen posible la formación de un recuerdo sobre ese evento (Mahan y Ressler, 2012). Así, durante el condicionamiento del miedo, el animal, durante la fase de adquisición emite respuestas conductuales adaptativas e incondicionadas que son típicas de su especie y que tienden a afrontar la situación amenazante que experimenta. Sin embargo, simultáneamente genera recuerdos que durante la fase de evocación le

ayudarán a anticipar el peligro que lo amenaza y a afrontarlo, consecuentemente, con más eficacia. Así, en la prueba del enterramiento defensivo condicionado usada en este trabajo de tesis, el animal arroja inicialmente aserrín al sitio de donde provienen las descargas eléctricas, pero aprende al mismo tiempo a asociar estas últimas con el electrodo. Los cambios en los circuitos neurales en el cerebro del animal como consecuencia de dicha experiencia, son la base de la formación del recuerdo de miedo hacia el electrodo. Por lo tanto, la respuesta de la rata ante la presencia del electrodo, será el enterramiento defensivo, aún cuando éste ya no genere descargas eléctricas y no represente un peligro real.

8.2 Expresión de EGR-1

Se han reportado cambios en la expresión de EGR-1 (o del ARNm de *egr-1*) al condicionar la conducta defensiva de inmovilidad de ratas mediante el condicionamiento al contexto (Rosen, 1998; Malkani y Rosen, 2000), el condicionamiento auditivo a un click (Hall et al., 2001b) y a un tono (Maddox et al., 2011). Sin embargo, los resultados reportados hasta ahora en relación a tal expresión han diferido entre laboratorios. En vista de tales discrepancias, se consideró de importancia evaluar la expresión de esta proteína utilizando un paradigma conductual distinto a los que se han empleado, el enterramiento defensivo condicionado, en el que la conducta de enterramiento que se observa emula formas de aprendizaje que son importantes para la sobrevivencia de los roedores en su ambiente natural.

Los resultados reportados en esta tesis junto con los de otros investigadores indican que independientemente del tipo de condicionamiento inducido, ya sea este de tipo contextual (Rosen et al., 1998; Malkani y Rosen, 2000) o a una señal discreta (nuestro laboratorio; Maddox et al. 2001), así como del diseño experimental utilizado, existe durante la adquisición de la respuesta condicionada, un aumento en la expresión de EGR-1 (o del ARNm de *egr-1*) en el núcleo La de la amígdala (ver tabla 2). Sin embargo, estos resultados difieren de lo reportado por Hall et al. (2000), quienes a pesar de haber encontrado también un aumento en la expresión de EGR-1 en este núcleo, éste fue similar al

observado en animales control que no fueron condicionados. Cabe señalar, que en los experimentos de Malkani y Rosen (2000), se detectó también un aumento en la expresión de EGR-1 dentro del núcleo La, en el grupo de animales que recibieron la descarga eléctrica inmediata, aunque éste fue de muy poca magnitud comparado con lo observado en el grupo de ratas que fueron condicionadas. Las razones de estas discrepancias son poco claras, sin embargo, existe la posibilidad de que el procedimiento para condicionar a los animales sea un factor importante a este respecto.

En contraste, la expresión del EGR-1 en el núcleo La, tras la evocación de la respuesta de miedo condicionado, solamente se observó en aquellos paradigmas que provocaron preferentemente condicionamiento a señales discretas, aunque nuevamente Hall et al. (2001b), a diferencia de lo observado por el grupo de Rosen, encontraron un aumento en la expresión del ARNm de *egr-1*. Es interesante que el patrón de expresión para el ARNm de *egr-1* similar al reportado en el núcleo La durante la evocación, fue observado también en los núcleos BLA y CeA, aunque en este caso, dichos cambios estuvieron presentes tanto durante la adquisición como durante la evocación de la respuesta de miedo (ver tabla 2).

Tabla 2. Expresión de EGR-1 en los núcleos La, BLA y CeA durante la adquisición y la evocación con diferentes modelos de condicionamiento aversivo		
Núcleo	Adquisición	Evocación
Lateral	↑ Rosen et al., (1998)* ↑ Malkani y Rosen, (2000)* -- Hall et al., (2000)* ↑ Maddox et al., (2011)+ ↑ <i>Nuestro laboratorio</i> #	-- Rosen et al., (1998) -- Malkani y Rosen, (2000) ↑ Hall et al., (2001b)*+ ↑ Maddox et al., (2011) ↑ <i>Nuestro laboratorio</i>
Basolateral	-- Rosen et al., (1998) -- Malkani y Rosen, (2000) ↑ Maddox et al., (2011) ↑ <i>Nuestro laboratorio</i>	-- Rosen et al., (1998) -- Malkani y Rosen, (2000) ↑ Hall et al., (2001b) ↑ Maddox et al., (2011) ↑ <i>Nuestro laboratorio</i>
Central	-- Rosen et al., (1998) -- Malkani y Rosen, (2000) ↑ Maddox et al., (2011) ↑ <i>Nuestro laboratorio</i>	-- Rosen et al., (1998) -- Malkani y Rosen, (2000) ↑ Hall et al., (2001b) ↑ Maddox et al., (2011) ↑ <i>Nuestro laboratorio</i>
↑ Aumento en la expresión de la proteína EGR- 1 -- No hubo diferencias significativas * Inmovilidad condicionada al contexto. + Inmovilidad condicionada a un sonido. # Enterramiento defensivo condicionado.		

Cabe señalar que tanto en nuestros experimentos como en los realizados por Rosen (1998), Malkani y Rosen (2000), Hall et al. (2001b), Maddox et. al (2011), se utilizaron choques eléctricos como estímulos incondicionados y dado que la amígdala recibe inervación del núcleo parabraquial con información nociceptiva somática, la posibilidad de que los cambios en la expresión de EGR- 1 observados por nosotros y los grupos anteriormente citados, haya sido consecuencia de las descargas eléctricas recibidas y no debidos al proceso de condicionamiento, aunque atractiva es poco probable. En apoyo a lo anterior, el paradigma del déficit del choque inmediato ofrece un buen control de la actividad de la amígdala ante el estímulo aversivo, el cual consiste en administrar una descarga eléctrica a un grupo de ratas inmediatamente al ser introducidas al dispositivo usado y a otro grupo tres minutos después; al final, tanto el

condicionamiento de la conducta de inmovilidad, como los cambios en la expresión del ARNm de *egr-1*, medidos 24 horas después, únicamente ocurren al administrar la descarga eléctrica demorada (Malkani y Rosen, 2000).

Los cambios en la expresión de EGR-1 en la amígdala durante el condicionamiento reportados en este trabajo son congruentes con los mecanismos que subyacen al condicionamiento del miedo (LeDoux, 2000; Davis y Whalen, 2001). El hecho de que en prácticamente todos los modelos y en particular, en aquellos en los que los animales fueron condicionados a una señal (“cue”), como en nuestro caso, la expresión de EGR-1 haya aumentado en el núcleo La durante la adquisición, está de acuerdo con que la amígdala desempeña una función preponderante en el condicionamiento a señales discretas y apoya la idea de que dentro de este núcleo, a partir de la información recibida sobre los estímulos condicionado e incondicionado, se generan los cambios plásticos que subyacen al condicionamiento del miedo. Sin embargo, en lo referente al papel de EGR-1 en el condicionamiento al contexto, las cosas parecen menos claras, pues aunque en los experimentos de Hall et al. (2000), no se registraron cambios en la expresión de esta proteína al utilizar el modelo del congelamiento condicionado, en los de Rosen et al. (1998) y Malkani y Rosen (2000), su expresión fue evidente en el núcleo La tras el condicionamiento de los animales mediante el paradigma del déficit del choque inmediato. Las razones que subyacen a estas diferencias se desconocen pero es probable que estén relacionadas con diferencias en las condiciones experimentales empleadas durante el condicionamiento de los animales. Así, mientras que en el grupo de Rosen las ratas fueron condicionadas tras su exposición a un contexto novedoso seguido de un choque eléctrico único, en los experimentos de Hall et al. (2000), los animales fueron sujetos a cinco apareamientos del estímulo condicionado con el no condicionado.

La manera como el EGR-1 se activa durante el condicionamiento del miedo y contribuye a los cambios plásticos asociados a ese proceso, así como a la consolidación y reconsolidación de los recuerdos formados no es completamente

conocido. Sin embargo, es comúnmente aceptado que el fenómeno de la LTP que subyace a la formación de un recuerdo regula la expresión de EGR-1, muy probablemente a partir de la activación de los receptores NMDA (Worley et al., 1990) y a través de la cadena de señalización que involucra a las MAP cinasas (Davis, 2003). Es entonces posible que CREB, que se encuentra en esta cadena de señalización “río abajo” de MAPK/ERK y que se ha demostrado que participa activamente en el condicionamiento del miedo (Hall et al., 2001a), sea el responsable directo de la activación de EGR-1. Por otro lado, aunque no se conoce la lista completa de los genes cuya transcripción regula EGR-1 y que pudieran ser significantes para el condicionamiento del miedo, se ha reportado que tanto la sinapsina I como la II son reguladas por el EGR-1 (Thiel et al., 1994; Petersohn et al., 1995), están involucradas en la regulación de la liberación de neurotransmisores y podrían participar en la plasticidad sináptica (Bähler et al., 1990).

Hasta ahora, se cuenta con muy poca información sobre la expresión de EGR-1 en los núcleos amigdalinos y la función específica de cada uno de ellos en la evocación de un recuerdo. Aunque como en el caso de la adquisición, existen diferencias entre laboratorios (Hall et al. Vs Rosen et al.), en relación a la expresión de EGR-1 en el BLA durante el condicionamiento al contexto, que podrían reflejar las diferencias durante el condicionamiento, nuestros resultados como los de otros laboratorios (Maddox et al., 2011) apoyan la participación de este factor de transcripción durante la consolidación de los recuerdos condicionados a señales discretas. Más aún, es muy probable que también como ha sido sugerido por estos últimos investigadores, este factor tenga una función importante durante el proceso de la reconsolidación, en la que los recuerdos evocados se hacen lábiles y para reconsolidarse/actualizarse se requiere como en el caso de la consolidación, de una síntesis de proteínas (Nader et al., 2000).

El aumento en la expresión de EGR-1 en el BLA observada en este trabajo, tanto en la adquisición como en la evocación, está de acuerdo con las observaciones de todos los laboratorios que la han estudiado en este núcleo (Hall

et. al., 2000b; Maddox et. al, 2011), con excepción de Rosen y colaboradores (Rosen et al. 1998; Malkani y Rosen, 2000). La falta de efectos observada en los experimentos del grupo de Rosen es sorprendente, pues existe una proyección masiva del La al BLA (LeDoux, 2000) y se ha encontrado dentro de los núcleos basales un “switch” que enciende y apaga la expresión de miedo (Herry et al., 2008; Amano et al., 2011; Palomares-Castillo et al., 2013). Aunque no resulta clara la causa de estas diferencias, es posible que estas obedezcan a variantes metodológicas sutiles pero importantes, pues una situación similar se observo en el CeA (ver abajo).

Por otro lado, el incremento en la expresión de EGR-1 en el CeA observado por nosotros y otros investigadores (Hall et al., 2001b; Maddox et al., 2011), tanto durante el condicionamiento a señales discretas como tras la evocación de las respuestas condicionadas, no resulta sorprendente si se considera que éste núcleo proyecta a las áreas responsables de implementar las respuestas conductuales, autonómicas y endócrinas que acompañan a una respuesta de miedo (LeDoux, 2000) y sobre todo que, como en el caso del La, también dentro de este núcleo se genera plasticidad asociada al condicionamiento del miedo (Paré et al., 2004). Cabe señalar, sin embargo, que como sucedió en el BLA, tampoco se observaron efectos en la adquisición ni en la evocación por parte de Rosen y su grupo (Rosen et al. 1998; Malkani y Rosen, 2000).

Los resultados anteriores, entre los que se incluyen los reportados en esta tesis, apoyan la participación de EGR-1 en el condicionamiento del miedo, que permite a los sujetos anticipar el peligro y preparase para afrontarlo. Sin embargo, el hecho de que EGR-1 participe también en otros tipos de condicionamiento no relacionados directamente con situaciones aversivas, tales como el Laberinto acuático de Morris o la alternancia espontánea en el Laberinto elevado en forma de “T” (Jones, 2001), sugiere que este factor de transcripción tiene un papel más general en el condicionamiento que pudiera estar relacionado con su participación como modulador de la expresión génica y por tanto, con la síntesis de proteínas involucradas en la consolidación de un recuerdo.

Así como se ha estudiado la expresión de EGR-1 en la adquisición y evocación de un recuerdo de miedo, también ha sido de interés conocer la actividad de otros genes de expresión temprana en tales procesos. Lonergan et al. (2010), estudiaron la expresión de *egr-1*, así como de otro gen de expresión temprana, *Arc/Arg3.1*, en el hipocampo dorsal después del condicionamiento del miedo y observaron que hubo un aumento en la expresión de *egr-1*, pero no así de *Arc/Arg3.1*, después del condicionamiento del miedo a un tono. Por otra parte, Rosen et al. (1998), encontraron un aumento en la expresión del ARNm de *egr-1* después del condicionamiento, sin embargo, la expresión del ARNm de *c-fos* en el La no fue diferente entre los grupos utilizados. Por último, Hall et al. (2001a), encontraron un aumento en la expresión de Fos en el CeA y del factor de transcripción CREB en el La y tanto de Fos como de CREB en el BLA, después de una prueba de memoria realizada 24 horas después del condicionamiento a un tono.

Finalmente, podría sugerirse que el EGR-1 podría estar participando en la regulación de la transcripción de otros genes que codifican para proteínas involucradas en la plasticidad sináptica que subyace a la consolidación y a la reconsolidación que sigue a la evocación.

8.3 Limitaciones

Debido a que durante la prueba de enterramiento defensivo condicionado las ratas presentan conductas defensivas tanto de tipo activo como pasivo, no es posible sugerir que la expresión de EGR-1 esté relacionada específicamente con alguno de estos dos tipos de conducta. Asimismo, se careció de un grupo control que sirviera para descartar experimentalmente los efectos de las descargas eléctricas sobre la expresión de EGR-1. Por último, el tamaño de los grupos experimentales y controles fue reducido, lo cual podría tener efectos sobre el análisis y por lo tanto, la interpretación de los resultados.

8.4 Perspectivas

Estudiar la expresión de EGR-1 en otros núcleos de la amígdala, utilizando el mismo modelo conductual que en esta tesis. Además, comparar los resultados con otro modelo experimental de condicionamiento del miedo en el que se utilice un estímulo aversivo distinto, como la presencia de un depredador.

Capítulo 9

CONCLUSIÓN

El aumento en la expresión de EGR-1 en la amígdala durante la adquisición y evocación del enterramiento defensivo condicionado sugiere su participación en el condicionamiento del miedo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel, T. y Lattal, K. M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, 11, 180-187.
- Aggleton, P., (1992). *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction*. Estados Unidos: Wiley-Liss Inc, 339-351.
- Amano, T., Duvarci, S., Popa, D. y Paré, D. (2011). The fear circuit revisited: contributions of the basal amygdale nuclei to conditioned fear. *The Journal of Neuroscience*, 31 (43), 15481-15489.
- Bäler, M., Benfenati, F., Valvorta, F. y Greengard, P. (1990). The synapsis and the regulation of synaptic function. *BioEssays*, 12 (6), 259-263.
- Bermúdez- Rattoni F. (2007). *Neural Plasticity and Memory, from genes to brain imaging*. Estados Unidos: Frontiers in Neuroscience, 157-173.
- Bliss y Collingridge (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31-39.
- Davis, M. (1997). Neurobiology of fear. *Journal of Neuropsychiatry*, 9 (3), 382-402.
- Davis, M. y Whalen, P. J. (2001). The amygdale: vigilance and emotion. *Molecular Psychiatry*, 6, 13-34.
- Davis, S., Bozon, B. y Laroche, S. (2003). How necessary is the activation of the immediate early gene *zif 268* in synaptic plasticity and learning?. *Behavioural Brain Research*, 142, 17-30.
- Darvas, M. Fadok, J. P., Palmiter, R. D. (2011). Requirement of dopamine signaling in the amygdale and striatum for learning and maintenance of a conditioned avoidance response. *Learning & Memory*, 18, 136-143.
- De Boer, S. F. y Koolhaas, J. M. (2003). Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *European Journal of Pharmacology*, 463, 145-161.

- De Cantazaro, D. A. (2001). *Motivación y emoción*. México: Pearson Educación, 116-131.
- De Olmos, J. S., Beltramino, C. A y Alheid, G. (2004). Amygdala and extended amygdala of the rat: A citoarchitectonical, fibroarchitectonical and chemoarchitectonical survey. En Paxinos, G. y Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Londres: Academic.
- Domjan, M. (2010). *Principios de aprendizaje y conducta*. Sexta edición. México: Wadsworth Cengage Learning.
- Dudai, Y. (2002). *Memory from A to Z. Keywords, Concepts and Beyond*. Oxford: Oxford Univ. Press, 6, 59, 210 y 221.
- Dudai, Y. (2004). The Neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology*, 55, 51-86.
- Flores G., Nucho, B., Crespo, R., Miledi, R., Fuxe, K., Pérez, de la M. (2010). GABA A p receptor mechanisms in the rat amigdala and its role in the modulation of fear and anxiety. *Psychopharmacology*, 212, 475-484.
- Gale G., Anagnostaras S., Godsil B., Mitchell S., Nozawa T., Sage R., Wilgen B., Fanselow M. (2004). Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. *Journal of Neuroscience*, 24 (15), 3810-3815.
- Gómez, C., Saldívar-González, J. A. y Rodríguez R. (2002). Modelos animales para el estudio de la ansiedad: una aproximación crítica. *Salud Mental*, 25 (1), 14-24.
- Hall, J., Thomas, K., Everitt, B. (2001a). Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nature Neuroscience*, 3 (6), 533-535.
- Hall, J., Thomas, K., Everitt, B. (2000). Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala. *European Journal of Neuroscience*, 13, 1453- 1458.
- Hall, J., Thomas, K., Everitt, B. (2001b). Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal, CA1 neurons

during the recall of contextual memories. *Journal of Neuroscience*, 21 (6), 2186-2193.

- Heinze, G. (2003). La ansiedad: cómo se concibe actualmente. *Ciencia*, 54 (2), 8-15.
- Herrera, D. G. y Robertson, H. A. (1996). Activation of c-fos in the brain. *Progress in Neurobiology*, 50, 83-107.
- Herry, C., Ciocchi, S., Senn, V., Demmou, L., Müller, C. y Lüthi, A. (2008). Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. *Nature*, 454, 600-608.
- Howard, C. V. y Reed, M. G. (1998). *Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy*. U.S.A.: BIOS. Scientific publishers. Springer, 69-95.
- Johansen, J. P., Cain, C. K., Ostroff, L. E. y LeDoux, J. E. (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, 147, 509-524.
- Jones, M., Errigton, M., French, P., Fine, A., Bliss T., Garel, S. y Charnay, P. (2001). A requirement for the immediate early gene *Zif268* in the expression of late LTP and long-term memories. *Nature Neuroscience*, 4 (3), 289-294.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. y Jessell, T. M. (2000). *Principles of neural science*. New York: Mc Graw-Hill- Health Division, 1227-1246.
- Kiernan, J. A. (1990). *Histological & histochemical methods: theory & practice*. Segunda edición. Gran Bretaña: Pergamon Press plc.
- Ko, S., Hu-Shan, A., Gallitano-Mendel, A., Chang-Shen, et al., (2005). Transcription factor *Egr-1* is required for long-term fear memory and anxiety. *Acta Physiologica Sinica*, 57 (4), 421-432.
- LaBar, K., LeDoux, J., Spencer, D. y Phelps, E. (1995). Impaired fear conditioning following unilateral temporal lobectomy in humans. *Journal of Neuroscience*, 15 (10), 6846-6855.
- Lázaro- Muñoz, G., LeDoux, J. E. y Cain, C. F. (2010). Sidman instrumental avoidance initially depends on lateral and basal amygdale and is constrained by central amygdale-mediated pavlovian processes. *Boil Psychiatry*, 67, 1120-1127.

- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 155-184.
- LeDoux, J. E. (2012). Rethinking the emotional brain. *Neuron*, 73, 653- 676.
- Lehmann, H., Triet, D. y Parent, M. (2003). Spared anterograde memory for shock-probe fear conditioning after inactivation of the amygdala. *Learning & Memory*, 10, 261-269.
- Lonergan, M. E., Gafford, G. M., Jarome, T. J. y Helmstetter, F. J. (2010). Time-dependent expression of Arc y Zif268 after acquisition of fear conditioning. *Neural plasticity*, 1-13.
- Maddox, S. A., Monsey, M. S. y Schafe, G. E. (2011). Early growth response gene 1 (Egr-1) is required for new and reactivated fear memories in the lateral amygdala. *Learning & Memory*, 18, 24-38.
- Mahan, A. L. y Ressler, K. J. (2012). Fear conditioning, synaptic plasticity, and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. *Trends in Neuroscience*, 35 (1), 24-35.
- Malkani, S. y Rosen, J. B. (2000). Specific induction of early growth response gene 1 in the lateral nucleus of the amygdala following contextual fear conditioning in rats. *Neuroscience*, 97 (4), 693-702.
- Malkani, S., Wallace, K. y Donley, M., et al., (2004). An egr-1 (zif268) Antisense Oligodeoxynucleotide infused into the amygdala disrupts fear conditioning. *Learning & Memory*, 11, 617-624.
- Maren, S. (2005). Building and burying fear memories in the brain. *The Neuroscientist*, 11 (1), 89-99.
- Medina, J. F., Repa, C. y LeDoux, J. E. (2002). Parallels between cerebellum-and amygdala-dependent conditioning. *Nature Reviews*, 3, 122-131.
- Moscarello, J. M. y LeDoux, J. E. (2013). Active avoidance learning requires prefrontal suppression of amygdala-mediated defense reactions. *Journal of Neuroscience*, 33 (9), 3815-3823.

- Nader, K., Schafe, G. E. y LeDoux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406, 722-726.
- Orsini, C. y Maren, S. (2012). Neural and celular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36, 1773-1802.
- Palomares, C. E., Hernández, P. O., Pérez, C. D., Crespo, R. M., Fuxe, K. y Pérez de la M. (2012). The intercalated paracapsular islands as a module for integration of signals regulating anxiety in the amygdala. *Brain Research*, 211-234.
- Papalia, D. E., Wendkos, O. S. y Duskin F. R. (2010). *Desarrollo humano*. México: Mc- Graw Hill.
- Papini, M. (2009). *Psicología comparada. Evolución y desarrollo del comportamiento*. México: Manual Moderno, 448-560.
- Paré, D. (2004). Role of the basolateral amygdale in memory consolidation. *Progress in Neurobiology*, 70, 409-420.
- Paxinos, G. y Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Segunda edición. E. U. A.: Academic Press.
- Pérez de la Mora, M., Jacobsen, K. X., Crespo, R., M., Flores-Gracia C., Hernández, G. A. et al. (2007). La amígdala, una estructura anatómica con relevancia para la ansiedad, en DeCelis, R. (Ed.), *Investigación en neurociencias*. Homenaje al Dr. Alfredo Feria Velasco, México: BiosMedica. 165-179.
- Pérez de la Mora, M. P., Gallegos-Cari, A., Arizmendi-Garcia, Y., Marcellino, D., Fuxe, K. (2010). Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Progress in Neurobiology*, 90, 198-216.
- Petersohn, D., Schoch, S., Brinkmann, D., Thiel, G. (1995). The human synapsin II gene promoter. *Journal Biology Chemistry*, 270, 24361-24369.

- Phelps, E. A. y LeDoux J. E. (2005). Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron*, 48, 175-187.
- Ploski, J. E., Park, K. W., Ping J., Monsey, M. S. y Schafe, G. E. (2010). Identification of plasticity-associated genes regulated by Pavlovian fear conditioning in the lateral amygdala. *Journal of neurochemistry*, 112, 636-650.
- Reeve, J. (2003). *Motivación y emoción*. Tercera edición. México: McGraw-Hill. 458.
- Rodrigues, S. M., Schafe, G. E. y LeDoux J. E. (2004). Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron*, 44, 75-91.
- Rosen, J. B., Fanselow, M. S., Young, S. L., Sitcoske M. y Maren S. (1998). Immediate- early gene expression in the amygdala following footshock stress and contextual fear conditioning. *Brain Research*, 796, 132-142.
- Rosen, J. B., Donley, M. P. (2006). Animal studies of amygdala function in fear and uncertainty: relevance to human research. *Biological Psychology*, 73, 49-60.
- Roozendaal, B., Koolhaas, J. M., Bohus, B. (1991). Central amygdala lesions affect behavioral and autonomic balance during stress in rats. *Physiology & Behavior*, 50, 777-781.
- Rozenzweig, M. R. y Leiman, A. I. (1992). *Psicología fisiológica*. España: McGraw- Hill, 688 y 689.
- Schafe, G. E., Nader, K., Blair, H. T. y LeDoux J. E. (2001). Memory consolidation of pavlovian fear conditioning: A cellular and molecular perspective. *TRENDS in Neuroscience*, 24 (9), 540-546.
- Selden, N., Everitt, B., Jarrard L. y Robbins T. (1991). Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive- conditioning to explicit and contextual cues. *Neuroscience*, 42, 335-350.
- Sierra-Mercado, D., Padilla-Coreano, N. y Quirk, G. J. (2011). Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and

basolateral amygdale in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*, 36, 529-538.

- Swason, L. W. y Petrovich, G. D. (1998). What is the amygdala?. *Trends Neuroscience*, 21 (8), 397-406.
- Terlecki, L. J., Pinel, J. P. y Treit D. (1979). Conditioned and unconditioned defensive burying in the rat. *Learning & Motivation*, 10, 337-350.
- Terleph, T. A. y Tremere, L. A. (2006). The use of Immediate early genes as mapping tools for neuronal activation: concepts and methods. Immediate early genes in sensory processing, cognitive performance and neurological disorders, 1-10.
- Thiel, G., Schoch, S. y Petersohn, D. (1994). Regulation of synapsin I gene expression by the zinc finger transcription factor zif268/erg- 1. *J Comp Neural*, 269, 15294-15301.
- Treit, D., Menard, J. y Pesold, C. (1994). The shock- probe burying test. *Neuroscience Protocols*, 94-010-02, 01-09.
- Worley, P., Cole, A., Saffen, D., y Baraban, J. (1990). Regulation of immediate- early genes in the brain: Role of NMDA receptor activation. *Progress Brain Research*, 277-285.