



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

TAREA CONDUCTUAL PARA ESTUDIAR LOS
MECANISMOS DE LA INHIBICIÓN ACTIVA DEL
MIEDO EN BUSCA DE RECOMPENSAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A:

ELIZABETH SARAHI ILLESCAS HUERTA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FRANCISCO SOTRES BAYÓN

2015

Ciudad Universitaria, D. F.





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

La presente tesis constituye parte del proyecto de investigación apoyado por el donativo No.176639 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como por los donativos No.IA200313 y No.IA200715 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM) y por el programa "IBRO Return Home Program 2012".

A mi madre y hermanas, por todo su amor...

Agradecimientos académicos

Al Dr. Francisco Sotres Bayón

Por recibirme en su laboratorio y por la confianza otorgada durante la realización de este proyecto. Agradezco la atención prestada en mi formación como estudiante, su apoyo y los conocimientos otorgados.

A la Dra. Leticia Ramírez Lugo

Por todo el apoyo brindado, tanto académico como personal, que hicieron posible la realización de esta tesis. Agradezco todos los valiosos consejos que me han permitido crecer como estudiante y como persona. Por tu amistad y por despertar en mí el amor a la investigación. Por todo y mucho más, gracias Lety.

A mis sinodales

Dr. Vladimir Orduña Trujillo, Dr. Antonio Zainos Rosales, Dr. Óscar Zamora Arévalo y la Dra. Corinne Montes Rodríguez., por sus valiosas aportaciones que enriquecieron este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Por la valiosa educación que ha hecho posible mi formación como Psicóloga.

Agradecimientos personales

A mi madre

Por ser un ejemplo de lucha, fortaleza y dedicación en la vida. Por motivarme a cumplir mis sueños y jamás rendirte conmigo. Por creer en mí y apoyarme en todo momento. Porque sin ti, nada de esto sería posible.

A mi padre

Porque a pesar de todo, me has dado razones suficientes para salir adelante. Porque quizás, de haber sido otra la historia yo no habría llegado hasta aquí. Gracias por no dejar que todo fuera tan fácil.

A mis hermanas

Por estar conmigo siempre que las he necesitado y apoyarme en los momentos difíciles. Vale: gracias por tu música y por ser fuente de alegría en mi vida. Anita: gracias por ser mi conciencia y alentarme a seguir adelante. Ambas son el mejor regalo que la vida me ha dado.

A mis sobrinos

Ángel, Tere e Isabel. Porque me han enseñado lo maravillosa que puede ser la vida con una simple sonrisa.

A Jenny

Porque a pesar de que nuestros caminos han tomado rumbos diferentes, siempre estás en los momentos precisos. Te llevo siempre conmigo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio

Por hacer del laboratorio una segunda casa. Agradezco especialmente a Julieta por todas las experiencias compartidas durante estos años. Gracias por tu valiosa amistad y por acompañarme durante mis horas interminables en el cuartito.

A mis amigos de la Facultad de Psicología

Por todo el estrés compartido durante la carrera, por su amistad y cariño: Gabriel, Jorge, Oscar, Anahi, Nubia, Víctor; gracias por todo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
Lista de abreviaturas	2
Lista de figuras y tablas	3
CAPÍTULO I	5
ANTECEDENTES	5
1.1 Miedo	5
1.2 Generación del miedo aprendido.....	6
1.2.1 <i>Adquisición del miedo aprendido</i>	8
1.2.2 <i>Mecanismos cerebrales del miedo condicionado</i>	11
1.3. Inhibición del miedo aprendido	13
1.3.1 <i>Mecanismos cerebrales de la inhibición pasiva del miedo</i>	15
1.4 Evitación del miedo aprendido.....	18
1.4.1 <i>Condicionamiento Instrumental</i>	19
1.4.2 <i>Tareas instrumentales de evitación</i>	22
1.4.3 <i>Teoría de los dos procesos y evitación</i>	28
1.4.4 <i>Mecanismos cerebrales de la evitación del miedo</i>	32
1.5 Inhibición activa del miedo.....	36
CAPÍTULO II	40
JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS	40
2.1 Objetivos	41
2.1.1 <i>Objetivo General</i>	41
2.1.2 <i>Objetivos específicos</i>	42
2.2 Hipótesis	42
CAPÍTULO III	43
MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1 Equipo conductual	43
3.1.1 <i>Caja de entrenamiento</i>	43
3.1.2 <i>Interface electrónica</i>	46
3.1.3 <i>Software MATLAB</i>	48
3.1.4 <i>Video</i>	50
3.1.5 <i>Software KRISA</i>	50

3.2 Entrenamiento de palanqueo.....	53
3.2.1 Sujetos.....	53
3.2.2 Restricción de alimento.....	53
3.2.3 Moldeamiento.....	54
3.2.4 Entrenamiento.....	54
3.2.5 Análisis de datos:.....	56
CAPITULO IV.....	57
RESULTADOS.....	57
4.1 Experimento 1.....	59
4.1.1 Objetivo.....	59
4.1.2 Procedimiento.....	59
4.2 Experimento 2.....	68
4.2.1 Resumen.....	68
4.2.2 Objetivos.....	68
4.2.3 Procedimiento.....	69
4.2.4 Discusión experimento 2.....	79
4.3 EXPERIMENTO 3.....	81
4.3.1Resumen.....	81
4.3.2 Objetivos.....	82
4.3.3 Procedimiento.....	82
4.3.4 Discusión experimento 3.....	103
CAPÍTULO V.....	108
DISCUSIÓN.....	108
5.1 Mecanismos conductuales de la inhibición activa del miedo en busca de recompensas.....	109
5.1.1 Entrenamiento apetitivo-seguro: uso de reforzadores primarios y estímulos discriminativos.....	110
5.1.2 Entrenamiento aversivo-peligroso: uso del condicionamiento clásico.....	112
5.1.3 Entrenamiento aversivo-peligroso: uso del condicionamiento instrumental.....	115
5.1.4 Entrenamiento de discriminación.....	117
5.1.5 Prueba de inhibición activa del miedo para obtener una recompensa.....	118

5.1.6 Extinción de la respuesta de inhibición activa del miedo.....	119
5.1.7. Teoría de los dos procesos y la inhibición activa del miedo en busca de recompensas	120
5.2 Perspectivas futuras	121
5.2.1 Mecanismos cerebrales de la inhibición activa del miedo en busca de recompensas	125
REFERENCIAS	131

RESUMEN

El miedo es un mecanismo de defensa esencial para la supervivencia que nos permite alejarnos del peligro. Sin embargo, cotidianamente nos encontramos con situaciones en las que es necesario enfrentar un peligro para obtener algo que deseamos, es decir inhibir activamente nuestro miedo para obtener una recompensa. A pesar de la importancia de este fenómeno psicológico se desconocen los mecanismos conductuales y cerebrales que lo hacen posible. En el presente trabajo se desarrolló una novedosa tarea conductual para estudiar este fenómeno en ratas de laboratorio. Nuestra tarea conductual implica presentar a los animales un conflicto motivacional: comer a pesar del miedo. Para esto, diseñamos un aparato automatizado y programable que consiste en una caja rectangular dividida en tres zonas: una zona peligrosa en donde los animales asociaron un sonido con una descarga eléctrica en las patas (condicionamiento clásico al miedo) y dos zonas seguras en donde asociaron una luz con la disponibilidad de comida al presionar una palanca (condicionamiento instrumental). En ratas bien entrenadas a discriminar ambos estímulos condicionados (apetitivo y aversivo), probamos si los animales son capaces de inhibir su miedo al cruzar por la zona peligrosa para obtener comida en la zona segura. Esto supone un desafío conductual en donde la rata tiene que elegir entre su miedo a una experiencia peligrosa o su motivación apetitiva para obtener una recompensa. Después de diversas modificaciones a los parámetros de entrenamiento y discriminación, logramos estandarizar un protocolo conductual donde la mayoría de las ratas lograron inhibir su miedo activamente para obtener la recompensa. Este modelo animal, sin antecedente, nos permitirá estudiar confiablemente los mecanismos conductuales y cerebrales de la inhibición activa del miedo en busca de recompensas.

Lista de abreviaturas

ATV: Área Tegmental Ventral

BA: Amígdala basal

BLA: Amígdala basolateral

CE: Amígdala Central

CPF: Corteza Prefrontal

CPFm: Corteza Prefrontal medial

db: decibeles

Desplz: Desplazamientos

E+: Estímulo discriminativo

EC: Estímulo Condicionado

E-E: descarga-descarga

EI: Estímulo Incondicionado

EN: Estímulo Neutro

EV: Estriado Ventral

Hipp: Hipocampo

IL: Infralímbica

LA: Amígdala Lateral

Lat: Latencias

mA: miliampers

NAcc: Núcleo Acumbens

PL: Prelímbica

RC: Respuesta Condicionada

R-E: respuesta-descarga

RI: Respuesta Incondicionada

RF1: Razón Fija 1

Lista de figuras y tablas

Figura 1.1 Adquisición del miedo condicionado.

Figura 1.2. Mecanismos cerebrales del miedo condicionado.

Figura 1.3. Inhibición pasiva del miedo condicionado.

Figura 1.4. Mecanismos cerebrales de la inhibición pasiva del miedo condicionado.

Figura 1.5. Evitación pasiva.

Figura 1.6 Evitación activa señalizada.

Figura 1.7. Evitación activa de operante libre.

Figura 1.8 Mecanismos cerebrales de la búsqueda de recompensas.

Figura 3.1. Equipo conductual de inhibición activa del miedo en busca de recompensas.

Figura 3.2. Diagrama de flujo de la automatización del equipo de inhibición activa del miedo en busca de recompensas.

Figura 3.3. Control del equipo mediante el Software MATLAB

Figura 3.4. Control del equipo mediante Software KRISA.

Figura 4.1. Entrenamiento apetitivo-seguro.

Figura 4.2. Entrenamiento aversivo-peligroso.

Figura 4.3. Entrenamiento de discriminación.

Figura 4.4. Entrenamiento apetitivo-seguro: asociación luz continua con disponibilidad de comida.

Figura 4.4. Entrenamiento apetitivo-seguro: cruces seguros.

Figura 4.5. Entrenamiento aversivo-peligroso.

Figura 4.6. Entrenamiento de discriminación.

Figura 4.7. Entrenamiento apetitivo-seguro: asociación luz continua con disponibilidad de comida.

Figura 4.8. Entrenamiento apetitivo-seguro: cruces seguros.

Figura 4.9: Entrenamiento aversivo-peligroso: asociación ruido blanco con presencia de descarga eléctrica.

Figura 4.10: Entrenamiento aversivo-peligroso: cruces peligrosos.

Figura 4.11: Entrenamiento de discriminación.

Figura 4.12. Prueba de inhibición activa del miedo en busca de recompensas.

Figura 4.13. Extinción de la respuesta de inhibición activa del miedo.

Figura 5.1. Modelo hipotético de interacción de circuitos cerebrales del miedo y la recompensa.

Tabla 4.1. Protocolo conductual de la inhibición activa del miedo en busca de recompensas.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Miedo

Recuerde una situación en la que haya sentido que su bienestar peligraba. Por ejemplo, piense en la primera vez que escuchó un fuerte trueno afuera de su casa o en la primera vez que tuvo que hablar frente a un público. En tales situaciones, es posible que haya sentido varios cambios en su cuerpo y en su manera de actuar. Probablemente su corazón comenzó a latir más rápido, sus manos comenzaron a sudar, y sus sentidos estuvieron más despiertos que nunca. Es posible que, ante tales situaciones, usted se haya quedado paralizado unos cuantos segundos, o bien que haya salido corriendo despavoridamente.

Lo descrito anteriormente son ejemplos claros de un fenómeno natural que ocurre en la mayoría de los animales, denominado miedo. El miedo es definido como un mecanismo de defensa que se produce ante la posibilidad de una amenaza o peligro inminente (Kim and Jung 2006, Johansen, Cain et al. 2011); es parte de una estrategia universal de supervivencia que nos permite responder de manera adecuada ante las condiciones del ambiente (Pape and Pare 2010, LeDoux 2012).

El miedo se caracteriza por la manifestación de respuestas activas y pasivas, en donde se ven involucrados diferentes sistemas fisiológicos y conductuales. Las respuestas pasivas tienen que ver con la inmovilización de los animales ante el peligro, y se expresan acompañadas de la inhibición del sistema autónomo (hipotensión y bradicardia), así como de la activación de las respuestas neuroendocrinas (liberación de hormonas del eje hipotálamo-hipófisis adrenal). Por su parte, las respuestas activas son aquellas que involucran el escape y la evitación del peligro y se encuentran mediadas por la activación simpática del sistema autónomo (hipertensión, taquicardia) (LeDoux 2000, Steimer 2002).

Si bien el miedo se expresa de manera innata ante cualquier estímulo naturalmente peligroso, existen mecanismos conductuales y cerebrales que permiten que pueda aprenderse. Es decir, los animales tienen la capacidad de usar los estímulos del ambiente como luces, sonidos, olores y contextos, para determinar si se encuentran en peligro. Con lo cual, pueden responder de manera anticipada ante las amenazas del ambiente y aumentar sus probabilidades de supervivencia (Johansen, Cain et al. 2011, Orsini and Maren 2012). Los miedos aprendidos son los que más se expresan en los animales, por lo que, en éste trabajo se abordará el tema del miedo en condiciones en dónde hay un aprendizaje de por medio.

1.2 Generación del miedo aprendido

En 1890 el fisiólogo Iván Pavlov descubrió que los animales son capaces de predecir la aparición de eventos de importancia biológica, a través de las señales ambientales que les preceden (Tarpy and Bourne 1982). En sus experimentos, Pavlov utilizaba perros con una fistula implantada en la boca para medir la cantidad de saliva y les presentaba dos diferentes estímulos: el primer estímulo era el sonido de un metrónomo, y el segundo estímulo la presentación de comida (Pavlov and Anrep 1927). La comida naturalmente provocaba la salivación de los perros y siempre se presentaba inmediatamente después del sonido del metrónomo. Después de repetir varias veces la presentación del metrónomo seguido de la exposición de la comida, Pavlov observó que el sonido del metrónomo por sí solo provocaba que los perros salivaran en anticipación a la comida (Domjan, Grau et al. 2010).

El sonido del metrónomo fue referido por Pavlov como un Estímulo Condicionado (EC), debido a que dependía de la presentación de la comida para provocar la salivación de los perros. Mientras que, la comida fue referida como un Estímulo Incondicionado (EI) porque éste provocaba naturalmente la salivación de los perros; no dependía de ningún otro estímulo para provocar la saliva. La salivación que fue provocada por el metrónomo se denominó Respuesta Condicionada (RC), y se llamó Respuesta Incondicionada (RI) a la salivación provocada de manera natural por la comida (Domjan, Grau et al. 2010).

Lo descrito anteriormente es un mecanismo conductual que puede ser adquirido por la mayoría de los organismos, denominado condicionamiento clásico o pavloviano. Este mecanismo conductual ocurre cuando dos estímulos diferentes (EC-EI) se presentan de manera simultánea y logran asociarse a tal punto que el primero (EC) predice la ocurrencia del otro (EI). La asociación del EC con el EI, resulta en que las respuestas naturales generadas por el EI puedan ser provocadas por la sola presencia del EC. Gracias al condicionamiento clásico los animales pueden responder y adaptarse a los eventos próximos a ocurrir, basados en la experiencia (Parkinson, Cardinal et al. 2000, Domjan, Grau et al. 2010).

Existen dos reglas fundamentales que permiten que el condicionamiento clásico se adquiera de manera exitosa: la contigüidad y contingencia de los estímulos. La relación de contigüidad se refiere a la temporalidad cercana con que ocurre la presentación del EI después de la ocurrencia del EC, lo cual, permite que ambos estímulos logren asociarse (Tarpy and Bourne 1982, Chance 2003). Por su parte, la regla de contingencia se refiere a la alta probabilidad que tiene el EI de ocurrir durante el EC y a la comparada con la baja probabilidad de su ocurrencia en ausencia del EC (Rescorla 1968, Mackintosh 1994). La importancia de la regla de contingencia fue establecida gracias a los experimentos realizados por Rescorla en 1968, en donde descubrió que cuando un EI se presenta con la misma probabilidad en presencia y ausencia de un EC hay una baja adquisición de la RC en los animales. Mientras que, si el EI se presenta con una alta probabilidad en presencia del EC y con una baja probabilidad en ausencia del mismo los animales muestran altos niveles de adquisición de una RC (Rescorla 1968). De modo que, para que un EC se vuelva un buen predictor de un EI no sólo es necesario que se presenten de manera contigua sino que además, el EI debe presentarse con mayor probabilidad durante el EC que en cualquier otro momento.

Hoy en día el condicionamiento clásico es uno de los modelos más utilizados para estudiar los mecanismos cerebrales del aprendizaje y la memoria en diferentes organismos, que van desde animales invertebrados

hasta los humanos (Pearce 1997). Gracias al condicionamiento clásico los investigadores han podido estudiar cómo los animales aprenden a responder a los estímulos del ambiente, no sólo aquéllos que predicen un evento apetitivo como la comida, sino también aquéllos que aseguran la proximidad de un evento aversivo; como se verá a continuación.

1.2.1 Adquisición del miedo aprendido

Sobre los principios básicos del condicionamiento clásico, muchos investigadores se interesaron por el estudio asociativo de respuestas emocionales como el miedo. En estos estudios suelen utilizarse estímulos naturalmente aversivos para condicionar a los animales a diferentes estímulos ambientales que son asociados como peligrosos. A este tipo de procedimiento se le denomina condicionamiento al miedo y es un paradigma conductual utilizado para el estudio de la adquisición y regulación de las memorias de miedo (LeDoux 2000).

En los experimentos típicos de condicionamiento al miedo se utilizan animales pequeños, como los roedores, para ser condicionados en cajas experimentales como la que se muestra en la figura 1.1. En estas condiciones, un estímulo neutro (EN) como un tono, una luz, o señales contextuales se utiliza como EC; mientras que, como EI se utiliza una breve descarga eléctrica en las patas de los animales (Domjan, Grau et al. 2010). Para realizar el condicionamiento al miedo, en un inicio los animales son colocados en la caja de condicionamiento sin la presentación de ningún estímulo para que los animales se habitúen al contexto (Figura 1.1A). La adquisición del condicionamiento al miedo ocurre con la presentación repetida de un tono (EC) seguido de la entrega de una descarga eléctrica (EI) (Figura 1.1B). La presentación repetida del EC y el EI provoca que los animales aprendan que el EC predice la ocurrencia del EI, es decir, que el tono predice la descarga eléctrica. Así, un día después, durante una prueba del condicionamiento al miedo la sola presentación del EC (Figura 1.1C) provoca respuestas de defensa condicionadas (RC) que de manera innata los animales presentan ante la anticipación de estímulos aversivos (Blair, Sotres-Bayon et al. 2005, LeDoux 2012).

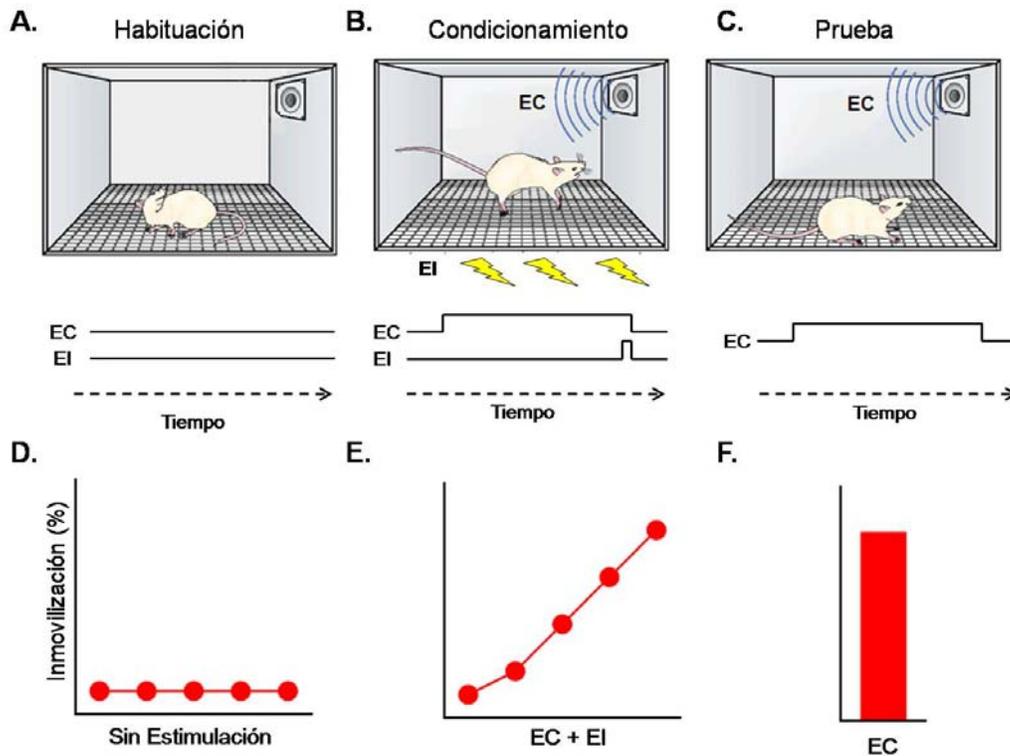


Figura 1.1. Adquisición del miedo condicionado. Se utiliza un tono como EC y una descarga eléctrica como EI. **A)** Habitación. Los animales son colocados en una caja experimental de condicionamiento y sin ningún estímulo. **B)** Adquisición del condicionamiento al miedo. Se presenta de manera repetida el EC seguido de la presentación del EI (5 presentaciones). **C)** Prueba del condicionamiento al miedo. Una sola presentación del EC provoca respuestas de defensa condicionadas como la inmovilización. La inmovilización es la total inactividad del cuerpo durante la presentación de un EC. Se representa como porcentaje de inmovilización con respecto al tiempo en que se presentó el EC. **D)** Porcentaje de inmovilización durante la habituación del Condicionamiento. Antes de la presentación de los estímulos los animales muestran bajos niveles de inmovilización. **E)** Porcentaje de inmovilización durante la adquisición del condicionamiento. El porcentaje de inmovilización incrementa progresivamente conforme se presenta de manera repetida la relación EC-EI. **F)** Porcentaje de inmovilización durante la prueba del condicionamiento. Niveles altos del porcentaje de inmovilización se mantienen cuando sólo el EC es presentado.

La conducta de defensa que más se ha estudiado en el condicionamiento al miedo es la inmovilización de los animales. La inmovilización es definida como la total inactividad del cuerpo (salvo la respiración) y la ausencia de movimientos de las vibrisas asociadas con el olfato (Domjan, Grau et al. 2010). Comúnmente se representa en porcentaje (%) de inmovilización con respecto al tiempo de presentación del EC, en donde se considera un condicionamiento eficaz cuando existen altos porcentajes de inmovilidad; es decir mayor tiempo

de inmovilización de los animales durante el EC. Antes del condicionamiento, durante la habituación, los animales expresan bajos niveles de inmovilización (Figura 1.1D), la cual aumenta progresivamente conforme avanza la adquisición del condicionamiento al miedo; siendo hasta el final del entrenamiento en donde se observan sus mayores niveles (Figura 1.1E). Los altos niveles de inmovilización vuelven a expresarse cuando el EC es presentado sin el EI, en una prueba de condicionamiento al miedo (Figura 1.1F). De modo que, la inmovilización es un parámetro con el cual puede decirse que los animales aprendieron eficazmente a asociar el tono como una señal de un evento aversivo.

Otra manera de medir la respuesta conductual del miedo durante el condicionamiento al miedo es mediante el procedimiento de Supresión Condicionada (SC). En este procedimiento, se entrena a los animales antes del condicionamiento a presionar una palanca para obtener comida. Una vez que los animales presionan la palanca a un ritmo constante, se realiza el condicionamiento al miedo. A medida que los animales adquieren el miedo condicionado suprimen la conducta de palanqueo, reemplazándola por la inmovilización ante el EC. La medida de la eficacia del condicionamiento al miedo es el grado en que el EC reduce la presión de la palanca. De modo que, cuanto menor sean las presiones de la palanca durante el EC, más efectiva se considera la adquisición del condicionamiento al miedo (Pearce 1997, Domjan, Grau et al. 2010). Mediante la SC los investigadores se aseguran de que la conducta de inmovilidad se deba únicamente a la asociación EC-EI, y no a otras posibles variables que involucren la motricidad o motivación del animal.

Un aspecto importante del condicionamiento al miedo es que la RC que se presenta después de la asociación EC-EI es de naturaleza innata, es decir, los animales no tienen que aprender a realizarlas. Lo que realmente se aprende durante el condicionamiento al miedo es una asociación que permite que un EN advierta un peligro, para así responder de manera anticipada ante un peligro real (LeDoux 2012). Actualmente el condicionamiento al miedo es el principal paradigma conductual para estudiar el aprendizaje del miedo, ya que es un procedimiento conductual fácil de implementar y que permite la

rápida y duradera adquisición de las memorias de miedo (Steimer 2002). Gracias a este paradigma conductual, hoy en día no solo se ha estudiado los mecanismos conductuales del miedo sino que además, se ha podido explorar los substratos cerebrales que permiten el aprendizaje y expresión del miedo.

1.2.2 Mecanismos cerebrales del miedo condicionado

El estudio de los mecanismos cerebrales del miedo comenzó gracias a los estudios realizados por Kluver y Bucy (1937), en donde observaron que monos con una ablación del lóbulo temporal redujeron su miedo natural a las serpientes (Klüver and Bucy 1937). A partir de este descubrimiento Weiskrantz (1956) lesionó diferentes estructuras que se ubican dentro del lóbulo temporal y descubrió que la amígdala fue la estructura cerebral que permitió la reducción del miedo en los monos de Kluver y Bucy (Weiskrantz 1956).

Actualmente, la evidencia experimental de diferentes manipulaciones farmacológicas y neurofisiológicas ha demostrado que la amígdala es la estructura cerebral que permite la adquisición y expresión de las memorias de miedo (Maren and Quirk 2004). En estudios en donde se ha lesionado por completo la amígdala, se ha encontrado una notable disminución de la respuesta de inmovilización en animales previamente condicionados (Blanchard and Blanchard 1972, Kim, Rison et al. 1993). Así mismo, se ha observado que la inactivación temporal de gran parte de la amígdala disminuye significativamente la inmovilización de los animales durante el entrenamiento y prueba del condicionamiento al miedo (Helmstetter and Bellgowan 1994, Muller, Corodimas et al. 1997). De modo que, la amígdala juega un importante papel en el condicionamiento al miedo.

La amígdala es una estructura subcortical que recibe información principalmente del tálamo, la Corteza Prefrontal (CPF), e Hipocampo (Hipp) y a su vez, manda información a estructuras cerebrales que regulan las respuestas de miedo (Kim and Jung 2006). La amígdala se encuentra conformada por aproximadamente 12 regiones o núcleos celulares, siendo la amígdala Lateral (LA), la Basal (BA) y la central (CE) las regiones más relevantes para el condicionamiento al miedo (LeDoux 2000). Dentro de la amígdala, el

procesamiento de información del condicionamiento al miedo sucede de la siguiente manera: la asociación del tono y la descarga eléctrica convergen dentro de la LA, que de manera directa o indirecta, a través de la BA, se comunica con la CE. Por su parte, la CE controla la expresión del miedo al enviar información a áreas específicas que se encargan de desencadenar las respuestas del miedo; como la materia gris periacueductual (GPA) que permite la inmovilización (Maren and Quirk 2004, Sotres-Bayon, Cain et al. 2006).

Recientemente, se ha encontrado que la expresión del miedo también puede ser regulada por la actividad de la corteza Prefrontal Medial (CPFm); específicamente por la región Prelímbica (PL) que se sabe conecta de manera recíproca con la BA (Vidal-Gonzalez, Vidal-Gonzalez et al. 2006, Sotres-Bayon and Quirk 2010). En un estudio en donde se inactivó de manera temporal la corteza PL se encontró que los animales, previamente condicionados al miedo, expresaron un menor porcentaje de inmovilización durante la prueba del condicionamiento (Sierra-Mercado, Padilla-Coreano et al. 2011). Mientras que, otro estudio demostró que la estimulación de la PL aumenta significativamente el porcentaje de inmovilización en animales condicionados (Vidal-Gonzalez, Vidal-Gonzalez et al. 2006); sugiriendo que la corteza PL participa activamente en la expresión de las memorias de miedo. En conjunto, el mecanismo cerebral que permite que los animales adquieran y expresen las memorias de miedo depende de la comunicación entre áreas corticales como la región PL de la CPF y regiones subcorticales como la Amígdala y la GPA; como se muestra en la figura 1.2.

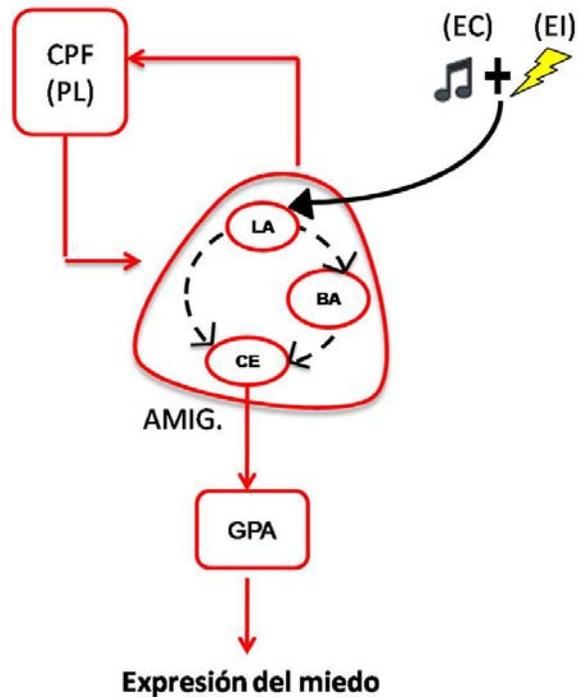


Figura 1.2. Mecanismos cerebrales del miedo condicionado. La amígdala es la región cerebral que permite la adquisición y expresión del miedo condicionado. Dentro de la amígdala la asociación del EC (tono) y EI (descarga eléctrica) convergen en la LA, que de manera directa o indirecta, a través de la BA, manda la información a la CE. La CE regula las respuestas de miedo al comunicarse con la GPA, quien permite la expresión de la inmovilidad. La región PL de la CPF también regula la expresión del miedo al comunicarse de manera recíproca con la amígdala, especialmente con la BA.

1.3. Inhibición del miedo aprendido

El estudio del condicionamiento al miedo nos ha permitido conocer los mecanismos conductuales y cerebrales que permiten que los animales aprendan a detectar el peligro y responder de manera anticipada ante éste. Sin embargo, la expresión del miedo no siempre es adecuada. El miedo puede presentarse de manera exagerada o en situaciones en las que ya no es necesario; por lo que, su expresión debe ser regulada. La manera en cómo se inhibe el miedo es mediante la extinción, un fenómeno que ocurre cuando un EC se presenta repetidamente en ausencia del EI; provocando que las RC se debiliten (Pavlov and Anrep 1927). En los animales condicionados a un tono, la adquisición de la extinción ocurre cuando el tono (EC) es presentado

repetidamente en ausencia de la descarga eléctrica (EI). La presentación repetida sólo del EC provoca que la inmovilización (RC) disminuya de manera progresiva (Figura 1.3A y 1.3B). La disminución de la inmovilización condicionada al tono, puede observarse un día después, si el tono vuelve a presentarse sin la descarga eléctrica durante una prueba de extinción (Figura 3.B y 3.D). Así, durante la extinción del miedo condicionado, los animales aprenden que un estímulo previamente asociado con un evento aversivo ya no es peligroso (Marek, Strobel et al. 2013).

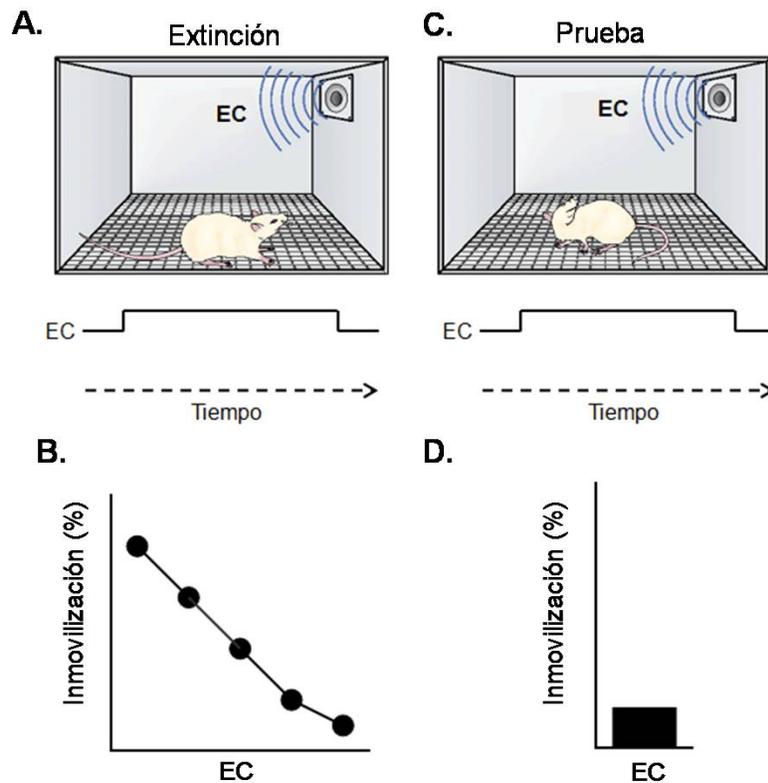


Figura 1.3. Inhibición pasiva del miedo condicionado. El miedo aprendido se inhibe mediante un proceso llamado extinción. En la extinción se presenta de manera repetida el EC en ausencia del EI, provocando que las RC se debiliten. **A)** Adquisición de la extinción. La extinción del miedo ocurre cuando se presenta repetidamente el EC en ausencia del EI. **B)** La inmovilización deja de presentarse de manera progresiva a través del entrenamiento de extinción. **C)** Prueba de extinción. El EC vuelve a presentarse en ausencia del EI. **D)** El decremento de la inmovilización vuelve a observarse durante la prueba de la extinción, cuando se presenta sólo el EC.

Durante mucho tiempo se explicó el proceso de extinción como un fenómeno de olvido o borrado de la memoria del condicionamiento, sin embargo, hoy en día es bien aceptado la existencia de una nueva memoria que inhibe la expresión de la memoria previa del condicionamiento (Bouton 2004, Domjan, Grau et al. 2010). La evidencia de que la extinción consiste en la adquisición de un nuevo aprendizaje radica en que después de la extinción, el miedo puede recuperarse con el paso del tiempo, al modificar el contexto en donde se adquirió la extinción, o con la presentación de un nuevo estímulo aversivo. Al regreso del miedo después de un tiempo de haberse extinguido, se le conoce como recuperación espontánea. Mientras que, el regreso del miedo por cuestiones contextuales y por la presencia de un estímulo aversivo, se le conoce como renovación y reinstalación del miedo respectivamente (Bouton 2004). Los fenómenos de recuperación espontánea, renovación y reinstalación del miedo demuestran que la extinción no puede ser consecuencia de un olvido o borrado de memoria, sino más bien de la adquisición de un nuevo aprendizaje (Sotres-Bayon, Cain et al. 2006, Quirk and Mueller 2008). Así mismo, demuestran que la inhibición del miedo mediante la extinción no es un fenómeno permanente.

Otro aspecto importante sobre la extinción es que su adquisición es un proceso lento y gradual. Para que un animal aprenda que el tono condicionado ya no predice la ocurrencia de la descarga eléctrica, son necesarias varias repeticiones del EC en ausencia del EI. De igual modo, durante la extinción los animales no tienen que realizar ninguna acción específica para inhibir el miedo; sólo se ajustan a las condiciones del ambiente (que se presenten o no los estímulos). Por lo que, la inhibición del miedo mediante la extinción es un fenómeno pasivo que ocurre de manera gradual y temporal.

1.3.1 Mecanismos cerebrales de la inhibición pasiva del miedo

Debido al importante papel que juega la extinción en la regulación de las memorias de miedo, se ha puesto gran interés sobre los mecanismos cerebrales que permiten que un animal aprenda a inhibir su miedo a un estímulo que ya no predice un peligro. La suficiente evidencia experimental ha sugerido que en la inhibición pasiva del miedo participan áreas cerebrales

corticales y subcorticales, especialmente la amígdala y la CPFm (Sotres-Bayon, Cain et al. 2006).

Dado que la actividad de la amígdala es crucial para el procesamiento de información del condicionamiento al miedo, su participación ha sido bastante estudiada en la extinción (Sotres-Bayon, Bush et al. 2004). De hecho, se ha encontrado que esta estructura participa tanto en la adquisición y expresión de la memoria de extinción (Sierra-Mercado, Padilla-Coreano et al. 2011). Otros estudios han sugerido que específicamente la amígdala Basolateral (BLA), que incluye a la LA y BA, regula la adquisición de la extinción (Quirk and Mueller 2008).

La participación de la CPF también ha sido evaluada en la extinción. En un estudio reciente se realizó lo siguiente: en ratas que fueron condicionadas al miedo se les lesionó la región Infralímbica (IL) de la CPFm y se les entrenó en un procedimiento de extinción. Se observó que durante la adquisición los animales lesionados aprendieron eficazmente a inhibir su miedo al EC. Sin embargo, durante la prueba de extinción, se observó que fueron incapaces de recordar que el EC ya no predecía el EI; es decir que el tono ya no predecía un peligro. De modo que, se concluyó que la corteza IL es necesaria para la expresión de la memoria de extinción; pero no para su adquisición (Quirk, Russo et al. 2000).

Lo anterior sugiere que para que un animal recuerde cuándo un estímulo ya no es peligroso, debe haber una eficiente comunicación entre la amígdala y la corteza IL. Como se observa en la Figura 1.4, se ha propuesto que esta comunicación es de tipo inhibitoria y está mediada por la actividad que tiene la IL sobre un grupo de neuronas inhibitorias que se encuentran en la amígdala; llamadas islas intercaladas (ITC). Cuando un animal recuerda el entrenamiento de extinción, las neuronas de la IL activa a las ITC. La activación de las ITC resulta en una inhibición (en lugar de excitación) de la CE, que a su vez inhibe la actividad de la GPA; provocando una disminución de la inmovilización (Sotres-Bayon and Quirk 2010). De modo que, la inhibición pasiva del miedo

ocurre gracias a la inhibición de la actividad de la amígdala mediada por la CPF (Figura 1.4)

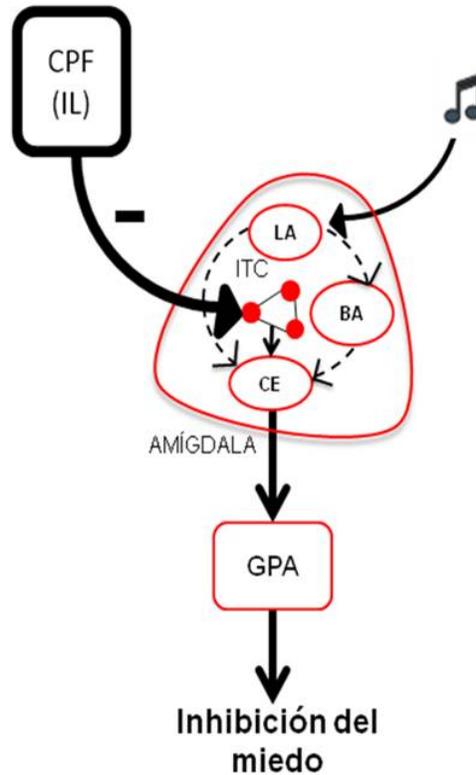


Figura 1.4. Mecanismos cerebrales de la inhibición pasiva del miedo condicionado. La comunicación inhibitoria entre la región IL de la CPFm, y la Amígdala permite que los animales recuerden cuando un estímulo ya no predice un evento peligroso. Específicamente, la IL activa a un grupo de neuronas inhibitorias dentro de la Amígdala; denominadas ITC. Las ITC se comunican con la CE, quien a su vez inhibe a la GPA; responsable de la inmovilización. Resultando en un decremento de la respuesta de inmovilización y por ende en la inhibición del miedo condicionado.

Actualmente, la extinción es el único mecanismo conductual que se ha explorado para estudiar la inhibición del miedo adquirido. La cual, como ya se mencionó anteriormente, tiene la desventaja de ser un proceso que se adquiere de manera pasiva, lenta y temporal. Otra forma en que se podría estudiar la inhibición del miedo podría ser de manera activa, en donde los animales puedan realizar una acción específica para inhibir las respuestas de miedo de

manera inmediata y permanente. Sin embargo, se conoce muy poco de los mecanismos conductuales y cerebrales que subyacen a la inhibición activa del miedo.

1.4 Evitación del miedo aprendido

Hasta ahora se han descrito los mecanismos cerebrales y conductuales de la expresión e inhibición pasiva del miedo. En tales procedimientos, los animales sólo se ajustan de manera adecuada a la presentación o ausencia de los estímulos aversivos. Sin embargo, en la naturaleza, los animales también pueden aprender a evitar el peligro. Este tipo de regulación de miedo ha sido estudiado mediante el empleo de tareas instrumentales de evitación, en donde la presentación del estímulo aversivo depende completamente de la conducta del animal (Kim and Jung 2006, Domjan, Grau et al. 2010, LeDoux 2012).

El estudio de la conducta de evitación surgió como parte de los procedimientos del condicionamiento clásico. Estos estudios fueron realizados por primera vez por el psicólogo Vladimir Bechterev, quien estaba interesado en estudiar el aprendizaje asociativo en sujetos humanos. En sus experimentos, Bechterev les pedía a los participantes que colocaran un dedo sobre una bandeja de metal. A continuación, les presentaba un estímulo de alerta que podía ser un tono o una luz, seguido de la presentación de una leve descarga eléctrica. En las primeras presentaciones, los participantes respondieron levantando el dedo rápidamente de la bandeja de metal al recibir la descarga eléctrica. Después de pocos ensayos, los participantes aprendieron a retirar el dedo en presencia del estímulo de alerta, evadiendo así la presentación de la descarga eléctrica (Domjan, Grau et al. 2010).

El procedimiento conductual descrito anteriormente, ejemplifica una de los factores más importantes de la conducta de evitación: la ejecución de una respuesta (retirar el dedo) para evadir la presentación de un estímulo aversivo. A este tipo de conductas se les denomina respuestas instrumentales, y se encuentran sujetas a un aprendizaje asociativo denominado condicionamiento instrumental. Antes de abordar los mecanismos conductuales y cerebrales de

la conducta de evitación, se describirá brevemente en qué consiste el condicionamiento instrumental.

1.4.1 Condicionamiento Instrumental

Los análisis teóricos y de laboratorio del condicionamiento instrumental comenzaron formalmente con el trabajo del psicólogo Edward Lee Thorndike cuya intención original era estudiar la inteligencia animal. En sus experimentos, Thorndike utilizaba gatos privados de comida (hambrientos) y los encerraba en cajas problema que él mismo había inventado. Afuera de las cajas problema colocaba comida a la vista del animal, que podía ser ingerida por éstos siempre y cuando lograran salir de la caja. Para lo cual, las cajas en su interior tenían algún dispositivo que al ser accionado permitía el escape del animal (por ejemplo, en algunas cajas, los gatos tenían que jalar de un aro pequeño para abrir el cerrojo que bloqueaba la puerta). Es decir, dentro de las cajas problema, los animales tenían que ejecutar una respuesta motora específica para salir y conseguir la comida (Tarpy and Bourne 1982, Feldman 1992, Chance 2003, Domjan, Grau et al. 2010).

En un inicio Thorndike observó que los animales tardaban mucho tiempo para realizar la respuesta correcta que les permitiría salir. Sin embargo, a medida que los gatos fueron expuestos a esta tarea, observó que la habilidad de los animales para abrir la caja aumentó progresivamente. Thorndike interpretó estos resultados como el reflejo de una asociación Estímulo-Respuesta (E-R). Cuando un gato era colocado en la caja problema emitía una variedad de respuestas típicas de un animal, algunas de estas respuestas resultaban en la apertura de la puerta. Estos escapes con éxito conducían al aprendizaje de una asociación entre los estímulos del interior de la caja y la respuesta de escape. Conforme más fuerte se hacía la asociación entre los estímulos de la caja y la respuesta de escape, más rápido salían los animales de la caja. Así mismo, la consecuencia apetitiva de esta respuesta (obtener la comida) fortalecía la asociación entre los estímulos de la caja y esa respuesta (Tarpy and Bourne 1982, Domjan, Grau et al. 2010). Gracias a sus experimentos Thorndike postuló la Ley del efecto. La cual establece que si una respuesta es seguida de un suceso satisfactorio (recibir comida) la asociación

E-R se fortalece. Mientras que, si la respuesta es seguida por un suceso molesto (no recibir comida) la asociación E-R se debilita, dicho de otro modo, la conducta está en función de sus consecuencias (Tarpay and Bourne 1982, Domjan, Grau et al. 2010).

Sobre los fundamentos establecidos por Thorndike, B.F. Skinner inició una serie de estudios que generarían un gran avance en la comprensión del aprendizaje y la conducta. A diferencia de los experimentos de Thorndike, en donde una vez realizada la respuesta instrumental necesaria para abrir la caja problema los animales recibían la comida (ensayos discretos), Skinner estaba interesado en la observación continua de la conducta del animal sobre su ambiente (Feldman 1992, Chance 2003, Domjan, Grau et al. 2010).

En sus experimentos, Skinner utilizaba ratas hambrientas y cajas experimentales (cajas de Skinner) equipadas con un dispensador de comida y un comedero. Skinner colocaba a las ratas dentro de las cajas y dejaba caer de manera automática pequeñas porciones de comida en el comedero. Después de que una rata se acostumbraba al ruido del movimiento del dispensador de comida y comía sin dificultad del comedero, Skinner instalaba una palanca y observaba la conducta libre del animal. A medida que la rata hambrienta exploraba su ambiente, de manera accidental presionaba la palanca. A continuación Skinner conectó la palanca al dispensador de comida, de tal modo que, cuando la rata presionara la palanca consiguiera la comida automáticamente (Domjan, Grau et al. 2010).

Al igual que Thorndike, Skinner observó que la conducta de presión de la palanca aumentaba su frecuencia drásticamente conforme recibieron las ratas el alimento (Mackintosh 1994, Chance 2003). Debido a que los animales operaban libremente sobre el ambiente experimental, los procedimientos conductuales ideados por Skinner son conocidos actualmente como condicionamiento operante; que es lo mismo que el Condicionamiento Instrumental establecido por Thorndike (Domjan, Grau et al. 2010).

A pesar de que sus investigaciones estuvieron separadas temporalmente, tanto Skinner como Thorndike observaron que las respuestas de un animal

pueden fortalecerse o debilitarse según sus consecuencias (Tarpy and Bourne 1982). El procedimiento que permite que una respuesta instrumental incremente o se fortalezca, se conoce como reforzamiento. Mientras que, el procedimiento que resulta en una disminución o debilitamiento de la respuesta instrumental se le conoce como castigo (Chance 2003, Domjan, Grau et al. 2010).

Existen dos tipos de reforzamiento, uno negativo y otro positivo. En el reforzamiento positivo la respuesta instrumental produce un estímulo positivo o apetitivo. Si el animal ejecuta la respuesta instrumental, el reforzador apetitivo se presenta. Si no realiza la respuesta instrumental el estímulo apetitivo se omite. Por lo que, existe una contingencia positiva entre la respuesta instrumental y el estímulo apetitivo. Por su parte, en el reforzamiento negativo la respuesta instrumental finaliza o previene la entrega de un estímulo aversivo. Por lo que, existe una contingencia negativa entre la respuesta instrumental y el estímulo aversivo (Chance 2003, Domjan, Grau et al. 2010).

En cuanto a los procedimientos que disminuyen una respuesta instrumental, también existen dos tipos. Uno es el castigo positivo, en el que la respuesta instrumental produce la entrega de un estímulo aversivo. Es decir, existe una contingencia positiva entre la respuesta instrumental y el estímulo resultante; pero el resultado siempre es un estímulo aversivo. Y el otro tipo es el castigo negativo, o mejor conocido como entrenamiento por omisión, en el cual la respuesta instrumental impide la entrega de un estímulo positivo. En este tipo de procedimientos está implicada una contingencia negativa entre la respuesta y el evento ambiental (Pearce 1997, Chance 2003, Domjan, Grau et al. 2010). Para que un reforzamiento o un castigo sean positivos o negativos depende completamente de la contingencia resultante entre la respuesta y el resultado (estímulo apetitivo y aversivo). Por lo que, la contingencia puede ser definida como aquello que se agrega (positivo) o no (negativo) al ambiente en donde opera el animal y que permitirá que una conducta incremente o se debilite.

Los trabajos de Thorndike y de Skinner son un ejemplo claro de reforzamiento positivo. En donde la respuesta instrumental requerida era por un lado jalar del aro para abrir el cerrojo y por otro, presionar la palanca. Ambas respuestas instrumentales tenían como resultado la obtención de un reforzamiento positivo o apetitivo (comida). Por lo que, en ambos ejemplos, los animales incrementaron la frecuencia con que ejecutaban la respuesta instrumental. Esto es importante porque ahora pasaremos a explicar aquellas respuestas conductuales que están regidas por un procedimiento de reforzamiento negativo, de las cuales hay dos tipos: escape y evitación (Silverman 1978, Domjan, Grau et al. 2010).

En el escape, la presentación de un estímulo aversivo puede interrumpirse si se realiza la respuesta instrumental. Mientras que, la evitación implica la programación de un estímulo aversivo para ser presentado en algún momento en el futuro, en este caso la respuesta instrumental previene la entrega del estímulo aversivo (Silverman 1978). Normalmente la respuesta de evitación y escape se pueden observar en un mismo procedimiento conductual, es decir, para que ocurra la evitación primero debe ocurrir el escape (Domjan, Grau et al. 2010).

A continuación se describirán detalladamente las diferentes tareas instrumentales de evitación que más se han utilizado para estudiar el miedo.

1.4.2 Tareas instrumentales de evitación

Evitación pasiva

En este tipo de tareas, los animales aprenden que la presentación de un estímulo aversivo puede evitarse mediante la omisión de una respuesta específica (Silverman 1978, Kim and Jung 2006). En un entrenamiento típico de evitación pasiva se utiliza una caja rectangular dividida en dos compartimentos, un compartimento oscuro y otro iluminado, que se encuentran separados por una puerta pequeña (Figura 1.5A). De manera natural, los animales tienen una preferencia por las zonas oscuras, y una aversión por las

zonas iluminadas. Por lo que, en la evitación pasiva se pone en conflicto esta preferencia innata de los animales (Levin and Buccafusco 2006).

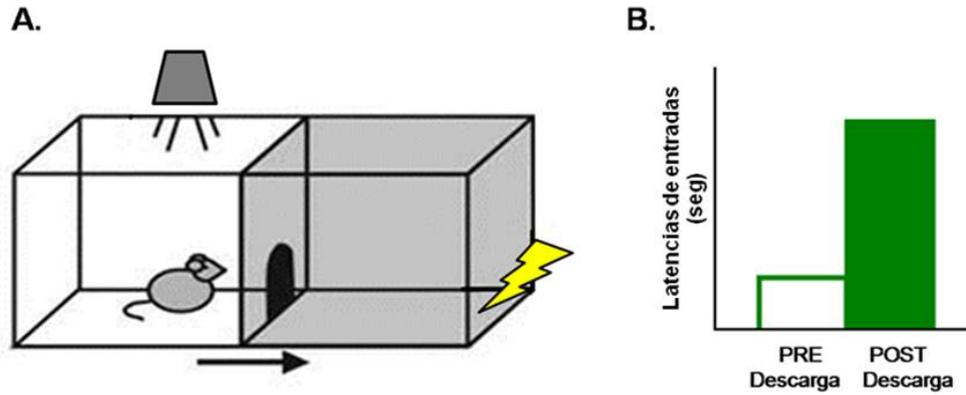


Figura 1.5. Evitación pasiva. A) Los animales aprenden a omitir (entrar a un compartimento oscuro) una respuesta para evitar la presentación de un evento aversivo (descarga eléctrica). Durante la adquisición de la respuesta de evitación, los animales asocian una descarga eléctrica con un compartimento oscuro. Por lo que un día después, durante la prueba de la tarea, los animales evitan entrar al compartimento oscuro. **B)** Tanto en la prueba como en la adquisición, se mide el tiempo en que tardan en entrar al compartimento oscuro (latencias de entradas) como una medida de la conducta de evitación. Si la latencia de entrada durante la prueba (POST Descarga) es mayor que durante la adquisición (PRE Descarga) se dice que el animal aprendió la respuesta de evitación pasiva.

La adquisición de la conducta de evitación pasiva, comienza cuando los animales son colocados en el compartimento iluminado con la puerta cerrada; por unos cuantos segundos. A continuación, la puerta se abre y se toma el tiempo en que el animal tarda en entrar al compartimento oscuro (latencias de entradas). Una vez ahí, la puerta se cierra y se entrega una descarga eléctrica de baja intensidad. De este modo, los animales asocian la zona oscura de preferencia con un evento aversivo o peligroso. Para evaluar el aprendizaje de evitación (Prueba), un día después, se coloca a los animales en la zona iluminada y se evalúa el tiempo en que tardan en entrar al compartimento oscuro; es decir, las latencias de entrada (Silverman 1978, Levin and Buccafusco 2006). Si la latencia de entrada durante la prueba es mayor que

durante la adquisición, se dice que el animal aprendió la respuesta de evitación pasiva (Figura 1.5B).

En la tarea de evitación pasiva, la contingencia negativa observada es la no presentación de la descarga eléctrica, lo cual, resulta en la adquisición de la respuesta instrumental de evitación (no entrar al compartimento oscuro). El inicio del entrenamiento de la evitación pasiva puede ser también un ejemplo de un procedimiento de castigo positivo, ya que la respuesta de entrar a la zona oscura fue consecuente con la descarga eléctrica y por ende, el resultado es el debilitamiento de la respuesta de entrar al compartimento oscuro. (Domjan, Grau et al. 2010). De igual modo, en esta tarea, se ha reportado la expresión de inmovilización en los animales al ser colocados en el compartimento iluminado, lo cual, también podría explicar por qué los animales no entran o tardan más tiempo en entrar al compartimento oscuro (Levin and Buccafusco 2006).

Evitación activa

A diferencia de la evitación pasiva, en donde los animales evitan la descarga eléctrica mediante la ausencia o disminución de una conducta motora específica (entrar a un compartimento oscuro), en la evitación activa se requiere de la realización de una respuesta motora específica del animal para evitar la presentación del evento aversivo (Domjan, Grau et al. 2010). Existen dos tipos de procedimientos de la evitación activa: la evitación activa señalizada y la evitación activa de operante libre.

✓ Evitación activa señalizada

En la evitación activa señalizada los animales aprenden a evitar un estímulo aversivo a través de la presentación de una señal o estímulo de alerta (Levin and Buccafusco 2006). Los experimentos de evitación realizados por Vladimir Bechterev, de quien se habló al inicio de este apartado, son un claro ejemplo de este tipo de tareas. Hoy en día, hay una mayor preferencia de los investigadores por utilizar animales experimentales (como los roedores) y cajas vaivén para el estudio de la evitación activa señalizada. Las cajas vaivén están conformadas por dos compartimentos idénticos, separados por una

abertura a nivel del piso que le permite al animal entrar y salir en uno (evitación de un sentido) o dos sentidos (evitación de dos sentidos); como se muestra en la figura 1.6A y 1.6B. (Silverman 1978, Domjan, Grau et al. 2010).

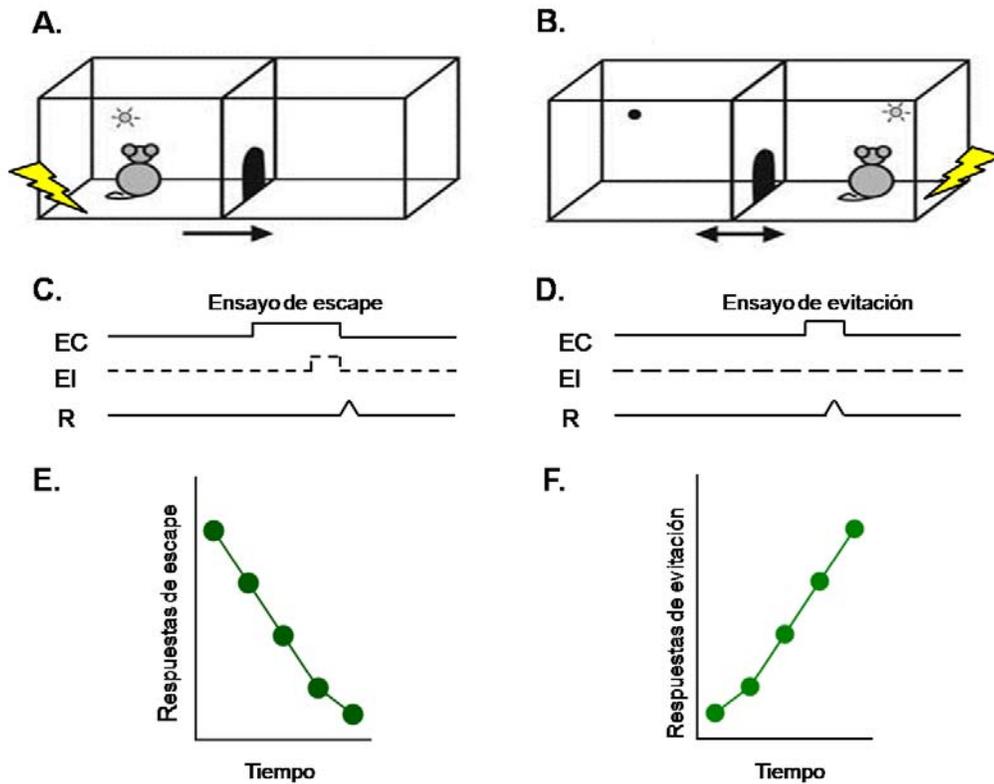


Figura 1.6. Evitación activa señalizada. Los animales evitan la presentación de un estímulo aversivo gracias a la presentación de una señal de alerta (EC). **A)** Caja vaivén de un sentido. Los animales se mueven siempre hacia el mismo compartimento para evitar la descarga eléctrica (EI). **B)** Caja vaivén de dos sentidos. Los animales cruzan de izquierda a derecha para realizar la respuesta de evitación y evitar la descarga eléctrica. **C)** Ensayo de escape. Al inicio del entrenamiento, los animales cruzan hacia el otro compartimento una vez que ha iniciado la descarga eléctrica. Por lo que, la respuesta de evitación termina con la presentación de la descarga eléctrica (EI). **D)** Ensayo de evitación. Los animales cruzan hacia el otro compartimento durante la presentación del estímulo de alerta y antes de la presentación de la descarga eléctrica. Por lo que, la respuesta de evitación previene la presentación de la descarga eléctrica. **E)** Representación del decremento de las respuestas de escape durante el entrenamiento de evitación. **F)** Representación del incremento de las respuestas de evitación durante el entrenamiento de evitación activa señalizada.

Al inicio de los experimentos de evitación activa señalizada los animales son colocados en algún lado de la caja vaivén. A continuación un estímulo de alerta, por ejemplo una luz o un tono, se presenta seguido de una descarga eléctrica. Lo que el animal debe realizar, para evitar la descarga eléctrica, es cruzar hacia el otro compartimento antes de que termine la presentación del estímulo de alerta. Así, la presentación del estímulo aversivo depende de que el animal realice o no la respuesta de evitación (cruzar hacia el otro compartimento) durante la presentación del estímulo de alerta (Silverman 1978, Levin and Buccafusco 2006, Domjan, Grau et al. 2010).

En un inicio, los animales raramente responden acertadamente con la respuesta de evitación. Por lo general inician cruzando hacia el otro compartimento una vez que ha comenzado la descarga eléctrica, lo cual, es definido como un ensayo de escape (Figura 1.6C). Con el entrenamiento continuo aprenden eficazmente a cruzar antes de la presentación de la descarga eléctrica, lo cual se denomina ensayo de evitación (Figura 1.6D). De esta manera, los animales pueden evadir durante toda una sesión de entrenamiento la descarga eléctrica (Levin and Buccafusco 2006, Domjan, Grau et al. 2010).

El desempeño de los animales en las tareas de evitación activa del miedo, comúnmente se evalúa midiendo el número de respuestas de evitación y de escape a través del tiempo. En donde se observa un incremento de las respuestas de evitación hacia el final del entrenamiento, mientras que, hay un decremento de las respuestas de escape hacia el final del mismo (Figura 1.6E y 1.6F).

✓ Evitación activa de operante libre o no señalizada

Anteriormente se describió la manera en que los animales aprenden a evitar un evento aversivo, gracias a la presentación de una señal que lo predice. Sin embargo, los animales también son capaces de evitar un evento aversivo aún sin la presencia de un estímulo o señal que lo prediga. Este tipo de respuestas han sido estudiadas mediante tareas conductuales de evitación,

denominadas de operante libre o no señalizadas (Silverman 1978, Fernando, Urcelay et al. 2014).

Las tareas de evitación de operante libre fueron introducidas por Murray Sidman en 1953 (Mazur 2006) y suelen realizarse comúnmente en cajas de Skinner como se muestra la figura 1.7A. En este tipo de tareas se utiliza una descarga eléctrica como estímulo aversivo y la respuesta típica de evitación consiste en la presión de una palanca. En una sesión de entrenamiento de operante libre, por lo general, la descarga eléctrica se programa para que ocurra siempre en un tiempo fijo; por ejemplo cada 5 segundos. Cada vez que los animales realizan la respuesta de evitación, presionar la palanca, obtiene un periodo de seguridad mayor que el periodo de la descarga por ejemplo 15 segundos. La repetición de la respuesta de evitación antes de que finalice el periodo, permite el reinicio de la etapa de seguridad una y otra vez. De este modo, los animales pueden evitar la descarga eléctrica durante toda una sesión de entrenamiento (Silverman 1978, Chance 2003).

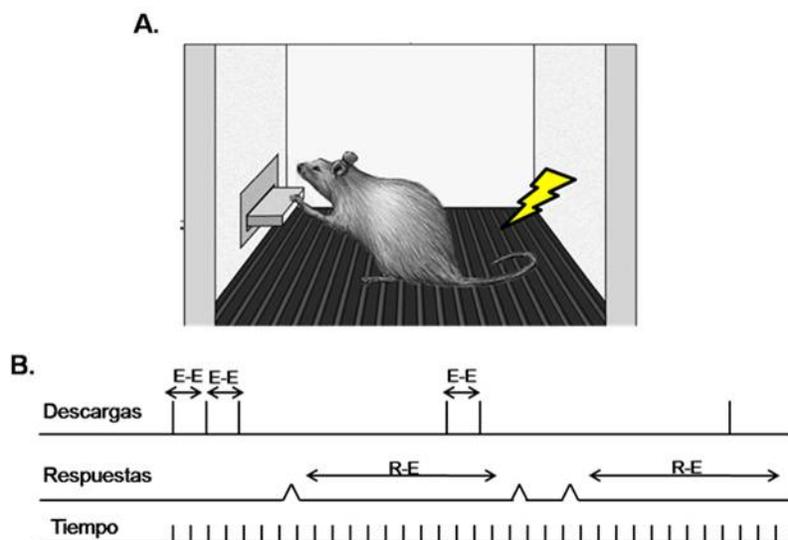


Figura 1.7. Evitación activa de operante libre. A) Caja de Skinner en donde se entrena a los animales. Se utiliza una descarga eléctrica como estímulo aversivo y como respuesta de evitación la presión de una palanca. **B)** Procedimiento de un entrenamiento de evitación de operante libre. Se utilizan dos intervalos fijos de tiempo para entrenar a los animales. Un intervalo entre descargas, que se presenta en ausencia de la respuesta (E-E) y un intervalo entre la respuesta de evitación y la siguiente descarga programada (E-R). La respuesta de evitación ocurre entre los intervalos R-E para evitar que se presenten las descargas eléctricas.

Así, en la evitación de operante libre se utilizan dos intervalos fijos de tiempo para entrenar a los animales. Uno de ellos es el intervalo entre descargas en ausencia de la respuesta, denominado E-E (descarga-descarga); es decir, cuando ocurre la descarga. El otro periodo importante es el intervalo entre la respuesta de evitación y la siguiente descarga eléctrica programada, llamado intervalo R-E (respuesta-descarga) que permite la ausencia de la descarga eléctrica (Figura 1.7B) (Silverman 1978, Domjan, Grau et al. 2010).

En este tipo de procedimientos, al igual que en la evitación activa señalizada, también se utiliza la tasa de respuestas de evitación (tasa de palanqueo) como una medida de aprendizaje. Las cuales, se ha demostrado, son sensibles a la duración de los intervalos E-E y R-E. Entre mayor sea la frecuencia con que se programa la descarga (intervalo E-E), más probable es que los animales aprendan la respuestas de evitación. De igual modo, el incremento de los periodos de seguridad (intervalos R-E) también facilita la adquisición de la respuesta de evitación (Domjan, Grau et al. 2010).

Los procedimientos de operante libre tienen la ventaja de que la respuesta de evitación sucede en cualquier momento del experimento, a diferencia de la evitación señalizada en donde debe hacerse justo antes de terminar la presentación del estímulo de alerta (Silverman 1978, Tarpy and Bourne 1982, Domjan, Grau et al. 2010). Sin embargo, la adquisición de la respuesta de evitación suele ser más difícil de entrenar (Domjan, Grau et al. 2010). La evitación no señalizada también ha sido estudiada en las cajas vaivén descritas anteriormente y en cajas de condicionamiento operante. Lo único que es diferente en una tarea de la otra, es la ausencia o presencia de un estímulo que prediga la ocurrencia el evento aversivo.

1.4.3 Teoría de los dos procesos y evitación

Los mecanismos conductuales por los cuales los animales adquieren las respuestas de evitación han sido explicados por la teoría de los dos procesos, postulada principalmente por Mowrer en 1947 (visto en Tarpy and Bourne 1982). La teoría de los dos procesos propone la participación de dos

mecanismos conductuales durante los entrenamientos de evitación: el condicionamiento clásico al miedo y el condicionamiento instrumental. El condicionamiento clásico es activado por las asociaciones del estímulo de advertencia (EC) con la descarga eléctrica (EI), y ocurre en los primeros ensayos en que el animal aún no aprende a realizar la conducta de evitación. Mientras que, el condicionamiento instrumental sucede cuando los animales ejecutan por primera vez la respuesta instrumental de evitación (cruzar al otro lado o presionar una palanca) en los ensayos de escape, lo cual, está relacionado con el reforzamiento negativo que incrementa la respuesta de evitación (Mackintosh 1994, Moscarello and LeDoux 2013).

La teoría de los dos procesos en un entrenamiento de evitación se explica de la siguiente manera: al inicio del entrenamiento, los continuos ensayos de escape permiten que la asociación del EC y el EI se fortalezcan y que el miedo condicionado incremente. El incremento en el miedo permite que los animales realicen la respuesta de escape antes de la presentación de la descarga eléctrica, provocando así la respuesta de evitación. La respuesta de evitación a su vez es reforzada por la terminación del EC, la contingencia negativa, ya que esto provoca una reducción del miedo (Tarpy and Bourne 1982). En otras palabras, la conducta de evitación ocurre gracias a la reducción o inhibición del miedo que la respuesta instrumental permite al interrumpir la presentación del EC (Mazur 2006). De este modo, la teoría de los dos procesos propone una dependencia mutua entre el condicionamiento clásico e instrumental, en donde, el reforzamiento instrumental de la respuesta de evitación no es posible hasta que el miedo se ha condicionado al EC (Domjan, Grau et al. 2010).

En los entrenamientos de evitación activa señalizada es muy fácil distinguir el aprendizaje pavloviano e instrumental que propician la realización de la respuesta de evitación, pero ¿qué ocurre con los procedimientos de evitación en donde no existe una señal que prediga la descarga eléctrica? La teoría de los dos procesos también ha tratado de explicar qué refuerza la conducta de evitación en las tareas en donde no existe una señal que prediga la descarga eléctrica. Se ha propuesto que en éstos procedimientos los animales aprenden a predecir la descarga eléctrica gracias a la temporalidad fija con que se

presentan los intervalos E-E y R-E, es decir, el paso del tiempo funciona como una señal que predice la presentación de las descargas eléctricas (Herrnstein and Hineline 1966). El que el tiempo prediga la presentación de la siguiente descarga eléctrica provoca miedo en los animales, el cual, es reducido si los animales realizan la respuesta de evitación. Por lo tanto, las señales temporales que predicen la descarga eléctrica pueden reforzar la conducta de evitación y cumplir la misma función que cumple el EC en la evitación activa discriminada (Herrnstein and Hineline 1966, Domjan, Grau et al. 2010).

A pesar de que la teoría de los dos procesos ha sido capaz de explicar tanto la evitación discriminada y de operante libre, esta teoría no ha podido explicar del todo la conducta de evitación. Muchos autores han señalado que la teoría de los dos procesos tiene graves problemas de predicción en cuanto a la participación del condicionamiento clásico al miedo. Por ejemplo, la teoría predice que el reforzamiento de la respuesta de evitación ocurre gracias a la disminución del miedo que produce el EC, por lo que, el miedo debe presentarse con mayor fuerza durante la presentación del EC y disminuir con la ejecución de la respuesta de evitación (Chance 2003, Mazur 2006). Sin embargo, la evidencia ha demostrado que la presentación del EC deja de provocar miedo en los animales conforme avanza el entrenamiento; cuestionándose qué es lo que realmente refuerza la respuesta de evitación (Mazur 2006).

Así mismo, otro de los errores que han cuestionado la participación del condicionamiento clásico es la poca o nula extinción que la respuesta de evitación tiene después de varios entrenamientos (Mazur 2006). De acuerdo con los principios básicos del condicionamiento clásico, existe un debilitamiento de la RC cuando el EC se presenta de manera repetida en ausencia del EI. Por lo que, en los entrenamientos de evitación, la respuesta de evitación debería de debilitarse después de varios ensayos en que ésta respuesta omitió la presencia del EI. Sin embargo, la mayoría de los estudios de evitación han observado una gran persistencia de la respuesta de evitación después de varios ensayos en que el EI ya no se presentó (Solomon, Kamin et al. 1953); lo

cual, ha cuestionado también la participación del condicionamiento clásico en la conducta de evitación.

Debido a los problemas de predicción que ha tenido la teoría de los dos procesos se ha planteado una segunda teoría para explicar el fenómeno de evitación, la cual, es conocida como la teoría de un proceso. La teoría de un proceso postula que sólo el aprendizaje instrumental es necesario para adquirir y mantener una respuesta de evitación, siendo innecesaria la presencia de una señal que prediga la ocurrencia de la descarga eléctrica (Chance 2003).

Lo propuesto por la teoría de un proceso fue comprobado por un estudio realizado por Herrnstein y Hineline, en donde entrenaron a ratas a evitar una descarga eléctrica que siempre se presentó bajo un promedio de diferentes probabilidades y no en un tiempo fijo. Es decir, sin que el tiempo pudiera predecir en qué momento se entregaría una descarga eléctrica. En una sesión de entrenamiento, las ratas podían presionar una palanca y recibir en promedio una descarga eléctrica cada 20 segundos; o bien, podían no presionar la palanca y recibir en promedio cada 7 segundos la descarga. Así, en algunos ensayos la descarga podía presentarse después de que la rata presionara la palanca, o no presentarse aún si la rata no presionaba la palanca. Los autores encontraron que la mayoría de las ratas aprendieron a presionar y evitar las descargas eléctricas, y que por ende el condicionamiento clásico no es necesario para que se adquiera y mantenga una respuesta instrumental de evitación (Herrnstein and Hineline 1966).

A pesar de los errores de la teoría de los dos procesos actualmente sigue vigente para explicar la conducta de evitación, en la cual, básicamente los mecanismos conductuales que permiten que un animal actúe evitando o escapando del peligro están regidos por el aprendizaje de asociaciones pavlovianas, que permite la detección de una situación aversiva o peligrosa, y de asociaciones del tipo instrumental que permiten la generación y mantenimiento de las respuestas activas de evitación del peligro. A raíz de estas interacciones se ha tratado de entender los substratos cerebrales que

permiten los mecanismos cerebrales de la evitación del miedo, como se vera a continuación.

1.4.4 Mecanismos cerebrales de la evitación del miedo

Debido a la participación del condicionamiento clásico y condicionamiento instrumental en las tareas de evitación activa, los mecanismos cerebrales que permiten la expresión del miedo y la búsqueda de recompensas han sido propuestos como posibles substratos cerebrales de la conducta de evitación. A continuación, se describirán algunos de los estudios que demuestran la participación del circuito del miedo en la conducta de evitación. Después se explicaran algunos de los mecanismos cerebrales que permiten la detección y búsqueda de recompensas, para finalizar con su participación en la conducta de evitación.

Mecanismos cerebrales del miedo y evitación

Como se describió anteriormente, el circuito cerebral que permite la adquisición y expresión del miedo condicionado está regulado principalmente por la amígdala y sus conexiones recíprocas con la CPF y con la GPA (ver figura 1.2). La participación de algunas de estas estructuras también se ha explorado en las tareas instrumentales de evitación, sobre todo en aquellas en donde se utiliza un EC para señalar la ocurrencia del EI. De hecho, muchos de los estudios que descubrieron el papel de la amígdala en el condicionamiento al miedo fueron realizados utilizando tareas instrumentales de evitación activa. En varios de estos estudios, se encontró que la amígdala es necesaria para que los animales realicen la respuesta instrumental de evitación (King 1958, Fonberg 1965).

Más recientemente, se ha estudiado la participación específica de los núcleos amigdalinos que permiten la adquisición y expresión de la conducta de evitación. Por ejemplo, se ha encontrado que la LA y BA participan en la adquisición de esta respuesta instrumental, y que daños en la CE facilitan la adquisición de la conducta de evitación en tareas instrumentales de evitación activa señalizada (Lazaro-Munoz, LeDoux et al. 2010). También, se ha encontrado que la conducta de evitación está regulada por la CPFm;

específicamente por la región IL, que como se describió, participa en la inhibición pasiva del miedo. En un experimento con ratas entrenadas en una tarea de evitación activa señalizada, a través de manipulaciones farmacológicas e histológicas, se encontró que la corteza IL facilita la conducta de evitación al comunicarse de manera inhibitoria con la amígdala; específicamente con la CE, que permite la expresión de respuestas pasivas del miedo como la inmovilización (Moscarello and LeDoux 2013).

Mecanismos cerebrales de la recompensa y la conducta de evitación

El mecanismo cerebral que permite que los animales detecten, predigan y se aproximen a las recompensas ha sido estudiado mediante el condicionamiento instrumental apetitivo (Cardinal, Parkinson et al. 2002). Como se mencionó anteriormente, el condicionamiento instrumental es un mecanismo conductual que permite a los animales aprender a asociar estímulos y acciones específicas con la disponibilidad de recompensas. Utilizando el paradigma conductual del condicionamiento instrumental, en los años 50's Olds y Milner entrenaron a animales a presionar una palanca para recibir como recompensa una estimulación eléctrica en el cerebro. Se observó que algunas zonas cerebrales, al ser estimuladas incrementaron abruptamente la respuesta instrumental de palanqueo; por lo que, fueron llamados los centros del placer o del refuerzo del cerebro (Olds and Milner 1954). Actualmente se sabe que los centros de placer están conformados, en parte, por regiones cerebrales que forman parte del sistema mesoencefálico dopaminérgico del cerebro (Carlson 2014)

El origen del sistema dopaminérgico tiene lugar dentro del área Tegmental Ventral (ATV), que se localiza en el Mesencéfalo y se conecta principalmente con el Núcleo Acumbens (NAcc). El NAcc forma parte del Estriado Ventral (EV) y se ha definido como una estructura de interface entre el sistema motor y el sistema límbico del cerebro (Mogenson, Jones et al. 1980). La evidencia farmacológica ha demostrado que el circuito dopaminérgico que va del ATV hacia el NAcc es el responsable de los efectos reforzantes de las recompensas naturales como la comida, así como de la estimulación eléctrica y de la mayoría de las drogas (Fields, Hjelmstad et al. 2007). Así mismo, se ha

visto que esta conexión ATV-NAcc, no sólo permite la detección de las recompensas, sino que también, está encargada de la predicción de la disponibilidad de éstas (Mirenowicz and Schultz 1994, Kalivas and Nakamura 1999, Fields, Hjelmstad et al. 2007). Los estudios en donde se ha asociado un estímulo inocuo con una consecuencia apetitiva, han encontrado una activación de las neuronas dopaminérgicas del ATV que inicialmente se activaban solo con una recompensa naturales (Mirenowicz and Schultz 1994).

De igual modo, se ha visto que la CPF también participa en la búsqueda de recompensas, al recibir información por parte del ATV y conectarse recíprocamente con el NAcc; con lo cual, se propensa la liberación de dopamina dentro del NAcc cuando existe la disponibilidad de una recompensa (Carlson 2014). Por su parte, también se ha descrito al NAcc como una estructura que posibilita la realización de respuestas o acciones específicas para aproximarse a las recompensas. Lo cual es posible gracias a la conectividad del NAcc con diferentes regiones cerebrales implicadas en el movimiento, como el globo pallidus, la CPF, la corteza motora, premotora y motora suplementaria (Carlson 2014). En conjunto, cuando un animal aprende a presionar una palanca (respuesta instrumental) para obtener comida (recompensa), se activa la vía dopaminérgica del ATV y NAcc; el cual, a su vez, desencadena respuestas de acercamiento al actuar sobre los sistemas motores que permiten la expresión de una conducta (comer) (Figura 1.8).

Sobre las bases cerebrales del condicionamiento instrumental, se ha tratado de estudiar los mecanismos cerebrales de la conducta de evitación del miedo. Mediante diversas técnicas farmacológicas se ha evaluado la participación del EV, del cual el NAcc forma parte, en tareas instrumentales de evitación activa señalizada. Los estudios en donde se ha lesionado de manera permanente el EV, han encontrado deficiencias en la adquisición de la respuesta de evitación (Wendler, Gaspar et al. 2014). Este mismo efecto también se observó en una novedosa tarea de evitación activa en donde entrenaron a ratas a evitar una descarga eléctrica trepando a una plataforma segura (Bravo-Rivera, Roman-Ortiz et al. 2014). Por lo que, es posible que el

EV esté involucrado en cualquier respuesta instrumental que permita la evitación de un estímulo aversivo.

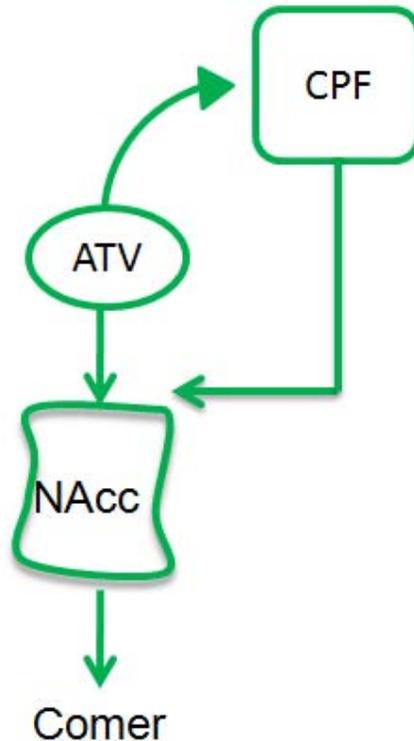


Figura 1.8. Mecanismos cerebrales de la búsqueda de recompensas. Para que un animal aprenda a predecir la disponibilidad de recompensas y aproximarse a ellas, es necesaria la comunicación dopaminérgica que existe entre el ATV y el NAcc. El cual a su vez desencadena las respuestas motoras necesarias para permitir la aproximación de los animales hacia las recompensas, a través de la CPF y otras áreas de los sistemas motores cerebrales (no mostradas en el diagrama).

Adicionalmente, se ha demostrado la participación específica del NAcc en la conducta de evitación. En un estudio en donde entrenaron a los animales a evitar una descarga eléctrica presionando una palanca (evitación de operante libre), se encontró que el NAcc es necesario para que los animales realicen eficazmente la respuesta instrumental de evitación (Fernando, Urcelay et al. 2014). Esto corrobora con un estudio reciente en donde evaluaron la participación del NAcc y su conexión con la Amígdala en una tarea de evitación activa señalizada tradicional (Ramirez, Moscarello et al. 2015).

Por último, la participación de la CPF en la conducta de evitación también se ha evaluado. En la tarea antes mencionada de evitación con plataforma, se encontró que la región PL de la CPF es necesaria para que los animales aprendan a trepar la plataforma segura y evitar una descarga eléctrica (Bravo-Rivera, Roman-Ortiz et al. 2014). Mientras que, en un estudio pionero en donde se utilizó la tarea de evitación activa señalizada convencional, no se encontraron efectos significativos en la respuesta de evitación al inactivar la corteza PL; pero sí en la región IL, (Moscarello and LeDoux 2013) que también forma parte de la CPF y se ha visto relacionada con la inhibición pasiva del miedo. De modo que, a pesar de que en la conducta de evitación no se ha propuesto un circuito cerebral claro que regule esta conducta, parece ser que los mecanismos cerebrales de las recompensas y del miedo están involucrados ampliamente en el momento en que un animal aprende a evitar el peligro. Por lo que, las tareas instrumentales de evitación parecen ser buenos modelos conductuales para estudiar cómo interactúan los mecanismos cerebrales y conductuales del miedo y las recompensas para dirigir la conducta de los animales.

Sin embargo, recientemente se ha denotado la vasta complejidad que tienen los entrenamientos conductuales de evitación para poder disociar claramente la interacción entre los procesos conductuales (condicionamiento al miedo y condicionamiento instrumental) y cerebrales (circuito del miedo y de recompensas) que permiten que la evitación se lleve a cabo. De ahí que aún no exista un buen modelo cerebral que permita explicar claramente la conducta de evitación. Por lo que, como se verá más adelante, se han empezado a implementar nuevas tareas conductuales para resolver las desventajas en las tareas instrumentales de evitación.

1.5 Inhibición activa del miedo

Hasta ahora, se han descrito los mecanismos conductuales y cerebrales que permiten que un animal aprenda a detectar y responder de manera activa (evitación, escape) y pasiva (inmovilización) ante el peligro. Sin embargo, no

siempre inmovilizarnos o evadir nuestros miedos es una respuesta óptima. En la naturaleza, cotidianamente nos vemos expuestos ante situaciones en las que es necesario enfrentar nuestros miedos para poder obtener algo que deseamos. Por ejemplo, vencer el miedo a enfrentarnos a una experiencia aversiva (como hablar en público) para poder obtener una recompensa (reconocimiento, diploma). En tales situaciones es necesaria la inhibición de las respuestas condicionadas de miedo tanto pasivas como activas.

Como se describió anteriormente, una manera en cómo se inhibe el miedo es mediante la extinción, un proceso que permite a los animales aprender que un estímulo ya no es peligroso. La extinción ocurre de manera pasiva, gradual y temporal, por lo que, ante una situación que requiera enfrentar el miedo a un peligro o evento aversivo podría ser ineficaz. Una forma eficaz de responder ante este tipo de situaciones es mediante la inhibición activa del miedo, con la cual, los animales podrían realizar una acción específica e inmediata que les permita romper con el miedo (inmovilización o evitación) y acercarse a la recompensa.

La inhibición activa del miedo para enfrentar un peligro, a pesar de ser un fenómeno común en la naturaleza, no ha sido muy estudiada y prácticamente se conoce muy poco sobre sus mecanismos conductuales y cerebrales. Una manera en cómo se ha podido explorar el afrontamiento de los miedos en seres humanos es mediante estrategias de regulación cognitiva. Las estrategias de regulación cognitiva son una serie de técnicas psicológicas que permiten la regulación o revaloración de emociones como el miedo. En algunos estudios en humanos se ha observado que los participantes son capaces de inhibir activamente el miedo a un estímulo aversivo, si realizan algo en específico; como imaginar una escena neutral (Hartley and Phelps 2010).

Un estudio reciente diseñó una tarea conductual en donde evaluaron el enfrentamiento activo y voluntario de un peligro en humanos. En este estudio, los investigadores utilizaron una serpiente real para provocar miedo en los participantes quienes podían decidir acercarse (enfrentamiento) o alejar (evitación) a la serpiente de ellos mismos. Encontraron que, a pesar de que la

presencia de la serpiente provocaba miedo en los participantes, muchos de ellos eligieron enfrentar activamente su miedo a la serpiente y permitir que ésta se acercara (Nili, Goldberg et al. 2010). Debido a la subjetividad y al poco control de variables extrañas en los experimentos con sujetos humanos, el enfrentamiento activo del miedo también ha sido evaluado en animales experimentales de laboratorio. De hecho, la conducta de escape y evitación a menudo son consideradas como estrategias activas de afrontamiento que permiten la inhibición y superación del miedo ante un evento asociado como peligroso (Cain and LeDoux 2007, Hartley and Phelps 2010).

En estas tareas la inhibición activa del miedo, no obstante, sólo abarca a las respuestas pasivas del miedo, como la inmovilización. La inhibición activa del miedo, en algunas ocasiones, no es adquirida de manera eficaz por todos los animales. A menudo, la respuesta de inmovilización es más perseverante ante el EC y la adquisición de la respuesta de evitación suele ser obstaculizada. Otra desventaja que tienen las tareas instrumentales de evitación es que, al igual que en los procedimientos de enfrentamiento del miedo realizados en humanos, no existe una recompensa por la cual los animales inhiban activamente su miedo. Los animales sólo realizan la respuesta instrumental para evitar un peligro y no para obtener una recompensa clara y específica. Esto, como se mencionó anteriormente, no permite disociar claramente la interacción entre los procesos conductuales (condicionamiento al miedo y condicionamiento instrumental) y cerebrales (circuito cerebral del miedo y de recompensas) que permiten que la evitación se lleve a cabo (Bravo-Rivera, Roman-Ortiz et al. 2014). Recientemente un estudio sugirió que esta desventaja se debe a que la respuesta de evitación no ocurre en un lugar seguro y libre de asociaciones con el estímulo aversivo (EI) (Bravo-Rivera, Roman-Ortiz et al. 2014). Por lo que, el mayor porcentaje de animales entrenados en estas tareas presentan más respuestas de inmovilización que de evitación. Por tal motivo, recientemente se diseñó una novedosa tarea de evitación activa con plataforma. La cual, consistió en entrenar a los animales a evitar la ocurrencia de una descarga eléctrica trepando a una plataforma segura. Así mismo, entrenaron a los animales a presionar una palanca por

comida, para evaluar la supresión de palanqueo como una medida indirecta del miedo. Mediante esta tarea los investigadores pudieron disociar y evaluar por separado los componentes motivacionales de la conducta de evitación; el miedo y la recompensa, lo cual, les permitió también evaluar por separado diferentes áreas cerebrales involucradas en el miedo y la búsqueda de recompensas (Bravo-Rivera, Roman-Ortiz et al. 2014).

Sin embargo, en esta tarea al igual que las tareas convencionales de evitación, no existe un enfrentamiento real de un peligro que motive a los animales a inhibir activamente su miedo a fin de obtener una recompensa. Por lo que, actualmente se desconocen los mecanismos conductuales y cerebrales de la inhibición activa del miedo para obtener una recompensa. Esto nos lleva a plantear la necesidad de proponer una tarea conductual en la que los animales tengan que inhibir su miedo de manera activa para obtener una recompensa.

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El estudio del miedo condicionado nos ha permitido conocer cómo los animales aprendemos a predecir el peligro, lo cual, es fundamental para nuestra supervivencia dado que nos permite alejarnos de aquellas situaciones que comprometan nuestro bienestar físico. Sin embargo, en la naturaleza, los animales no sólo se enfrentan ante estímulos que predicen la ocurrencia de eventos aversivos; continuamente también tienen acceso a aquellos estímulos que predicen la presencia de recompensas. Ambos estímulos, tanto aversivos como apetitivos, compiten por dirigir la conducta emocional, sobre todo en situaciones en las que es necesario que se inhiban los miedos activamente para poder enfrentar un peligro y así acercarse a las recompensas.

La inhibición activa del miedo para obtener una recompensa, a pesar de ser un fenómeno común en la naturaleza, no ha sido estudiada y sus mecanismos conductuales y cerebrales se desconocen. De tal manera, actualmente no existen modelos conductuales que permitan abordar específicamente este fenómeno. Los procedimientos conductuales con los que hoy en día se estudia la inhibición del miedo, como la extinción, sólo han permitido explorar la inhibición del miedo de manera pasiva y en condiciones en donde no hay una recompensa disponible.

De igual modo, las tareas conductuales que han permitido explorar las respuestas activas del miedo como la evitación, tampoco han resultado ser buenos modelos conductuales para aproximarse al estudio de la inhibición activa del miedo para obtener una recompensa. En la mayoría de estas tareas no existe un enfrentamiento real del peligro, ni una recompensa específica que motive a los animales a inhibir activamente el miedo, resultando ser tareas conductuales en donde sólo se inhiben las respuestas pasivas del miedo, como la inmovilización. Por lo que, es necesario el desarrollo de una tarea conductual que nos permita estudiar de manera específica los mecanismos conductuales de la inhibición activa del miedo en busca de recompensas. De esta manera,

una vez establecidos las características conductuales, se pueda usar como modelo para estudiar los mecanismos cerebrales de la inhibición activa del miedo en condiciones en donde hay una recompensa disponible.

Estudiar los mecanismos conductuales y cerebrales de la inhibición activa del miedo para obtener una recompensa, nos permitirá evaluar por primera vez cómo se regula el miedo en condiciones en donde hay una recompensa disponible. Así mismo, el desarrollo de una tarea conductual que rete a los animales a inhibir activamente su miedo a fin de conseguir una recompensa, podría ayudarnos a entender cómo los circuitos cerebrales que procesan la información referente al miedo y las recompensas interactúan para regular la conducta emocional de los animales; sobre todo cuando se encuentran frente a un conflicto motivacional en donde estímulos de valencia emocional se oponen. Algo que hasta ahora ha sido imposible estudiar en las Neurociencias.

Por tal motivo, el propósito de este trabajo fue desarrollar e implementar la primera tarea conductual de inhibición activa del miedo en busca de recompensas. Para lograr este objetivo, se buscó simular un conflicto motivacional es donde estímulos asociados con un evento aversivo y uno apetitivo compitieran por regular la conducta emocional de los animales, basado en la experiencia.

2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivo General

Desarrollar y estandarizar una tarea conductual que nos permita estudiar los mecanismos de la inhibición activa del miedo en busca de recompensas, en ratas de laboratorio.

2.1.2 Objetivos específicos

- Desarrollar un equipo conductual para estudiar la inhibición activa del miedo en busca de recompensas en ratas de laboratorio.
- Realizar un entrenamiento conductual en el que las ratas asocien dos señales ambientales con una consecuencia apetitiva y una aversiva.
- Realizar un entrenamiento conductual en el que las ratas busquen una recompensa guiadas por señales aversivas y apetitivas.
- Realizar un entrenamiento conductual en el que las ratas discriminen, a través de señales aversivas y apetitivas, condiciones seguras y peligrosas para conseguir una recompensa.
- Entrenar a las ratas a inhibir su miedo de manera activa a una señal aversiva a fin de conseguir una recompensa.

2.2 Hipótesis

Dado que dos motivaciones opuestas (apetitiva vs aversiva) son mutuamente excluyentes, un modelo conductual que presenta el desafío explícito de dos motivaciones de valencia emocional opuesta en competencia (comer vs temer), permitirá estudiar los mecanismos que hacen posible que se inhiba el miedo cuando existe una recompensa disponible.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

Para estandarizar la tarea de inhibición activa del miedo en busca de recompensas, desarrollamos un equipo conductual automatizado para ser probado en ratas de laboratorio. Así mismo, se realizó un entrenamiento conductual para que los animales aprendieran a recibir comida al presionar una palanca.

3.1 Equipo conductual

El diseño, fabricación y automatización del equipo conductual se desarrolló con la colaboración con un grupo de ingenieros (OMINIALVA M.R). Algunos de los elementos que componen el equipo conductual, fueron modificados e instalados de acuerdo a las necesidades encontradas durante la estandarización de la tarea (ver sección de resultados). En los siguientes apartados de esta sección, se describe la versión final del equipo conductual que nos permitió elaborar este proyecto.

3.1.1 Caja de entrenamiento

Se fabricó una caja de acrílico transparente de 100 cm de largo x 30 cm de ancho x 50 cm de alto, sostenida por una base de acero inoxidable (110 cm largo x 60 cm de alto y 45 cm de ancho). El piso de la caja se dividió en tres secciones: dos zonas seguras (en los extremos) y una zona de peligro (en la parte central), como lo muestra la figura 3.1A.

La zona de peligro corresponde a una parrilla de 60 cm de longitud y 30 cm de ancho, conformada por 40 barras de acero inoxidable. Cada barra tiene 4.8 mm de diámetro y 12 mm de separación entre sí. Las barras metálicas se encuentran sujetas mediante un soporte de material aislante (nylamid), y están conectadas, mediante un cable calibre 22, con aquella que se encuentra ocho posiciones antes y con aquella que se ubica ocho posiciones después. La parrilla se encuentra conectada a un equipo que transmite corriente eléctrica

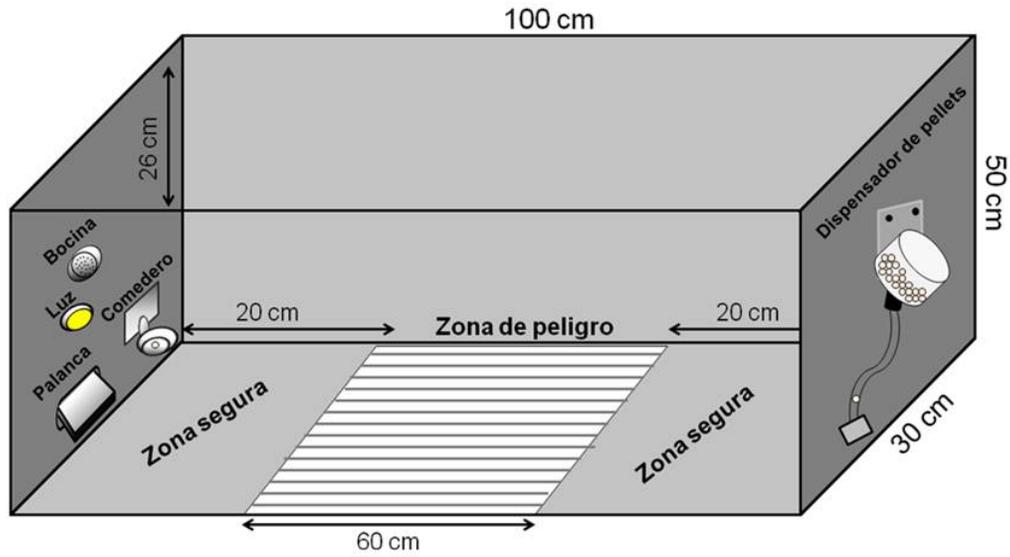
de alta y baja intensidad (Coulbourn, Precision animal shocker, modelo H13-15). Este equipo genera un patrón aleatorio de voltajes entre ocho terminales con la particularidad de que entre cualquier par de las ocho terminales siempre existe un voltaje diferente a cero.

Las zonas seguras están conformadas por plataformas de acrílico opaco como piso, con dimensiones de 20 cm de largo y 30 cm de ancho. Sobre las caras laterales de las zonas seguras se encuentran cinco elementos: un dispensador de pellets (Bio Serv-Product#F0021-dustlees precisión pellets, 45 mg), una palanca de acero inoxidable con sensor tipo microswitch de baja resistencia mecánica, un comedero de acero inoxidable, un indicador luminoso con lámpara incandescente de 6V/0.25A y una bocina de 2 pulgadas de 8 Ohms.

El dispensador de pellets (7.5 cm x 7 cm) se ubica en la parte posterior de las caras laterales de las zonas seguras y se encuentra conectado al sensor de baja resistencia que conforman las palancas. Así el dispensador, es activado automáticamente al presionar las palancas con un mínimo de fuerza necesaria. Las palancas (4 cm largo X 2.5 cm de ancho) y los comederos (5 cm largo x 5 cm de ancho) están ubicados a 2 cm del límite inferior de la cara lateral (lado anterior) de las zonas seguras; se encuentran separados de los costados derecho e izquierdo por 6.5 cm y separados entre sí por 3 cm de diferencia (Figura 3.1.B)

Los indicadores luminosos están posicionados 12 cm arriba de la palanca, separados 9 cm del costado izquierdo y 17.5 cm del costado derecho. Las bocinas se colocaron 5 cm arriba del indicador de luz, con 26 cm de separación del límite superior de la cara lateral (Figura 3.1.B).

A.



B.

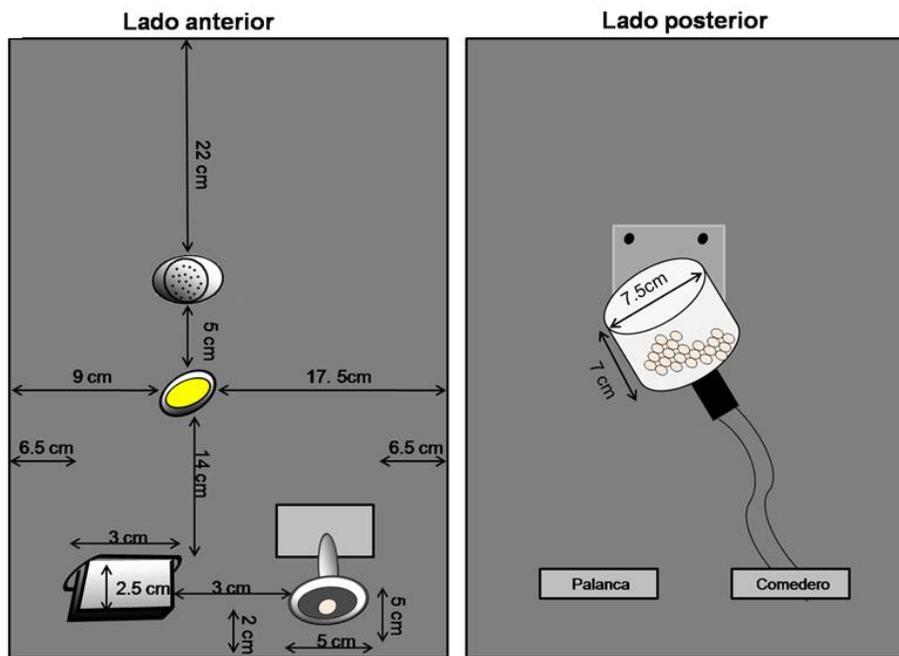


Figura 3.1. Equipo conductual de inhibición activa del miedo en busca de recompensas. A) Representación visual del diseño y dimensiones de la caja de entrenamiento fabricada para estandarizar la conducta de inhibición activa del miedo en animales experimentales. **B)** Se muestran las dimensiones de los elementos que componen las dos caras laterales de las zonas seguras de la caja de entrenamiento: bocinas, indicadores de luz, comederos, palancas (lado anterior) y dispensadores de pellets (lado posterior).

Para detectar la ubicación de los animales dentro de la caja se instalaron en los bordes externos de la caja de entrenamiento 18 pares de elementos infrarrojos (emisor-detector). La separación entre cada par infrarrojo es de 5 cm y están ajustados a la altura de los animales experimentales. De esta manera al desplazarse los animales a lo largo de la caja de entrenamiento interrumpen el haz infrarrojo de algunos pares y así es posible registrar el tiempo exacto (con una resolución de milisegundos) en que cruzaron de una zona a otra (ver sección de resultados para más detalles).

Así mismo, se colocó un diodo emisor de luz roja (LED) en un costado superior de la caja de entrenamiento. El LED rojo se programó para ser activado de manera simultánea con la activación de las bocinas, con lo cual, fue posible grabar y visualizar mediante una cámara de video el momento exacto en que los estímulos auditivos se presentaron (ver sección de resultados para más detalles).

3.1.2 Interface electrónica

La caja de entrenamiento se diseñó para operar de manera automática mediante un programa para computadora personal, desarrollado a partir de la tarjeta de adquisición de datos (National Instruments, USB6105). Esta aplicación se ejecutó sobre Windows 7. Consta de una interface de usuario desarrollada para ejecutarse en códigos de MATLAB y una aplicación de control desarrollada sobre las funciones NI-DAQ de National Instruments.

La comunicación entre la aplicación de MATLAB y la tarjeta de adquisición de datos es bidireccional. Nos permite controlar la entrada de información (presentación de los estímulos) y procesar la salida de información (respuestas conductuales) de la caja de entrenamiento. Lo cual, se realiza de la siguiente manera:

Desde la computadora personal, seleccionamos los parámetros de presentación de los estímulos (luces, sonido, descarga eléctrica y pellets) mediante la aplicación de MATLAB. Esta información llega a la tarjeta de adquisición de datos, que a su vez, se comunica directamente con la caja de

entrenamiento para presentar los estímulos. La información arrojada por la caja de entrenamiento (respuestas conductuales) regresa a la tarjeta de adquisición de datos, que a su vez, manda esa información a la computadora personal, en donde es registrada y almacenada desde la aplicación de MATLAB (Figura 3.2).

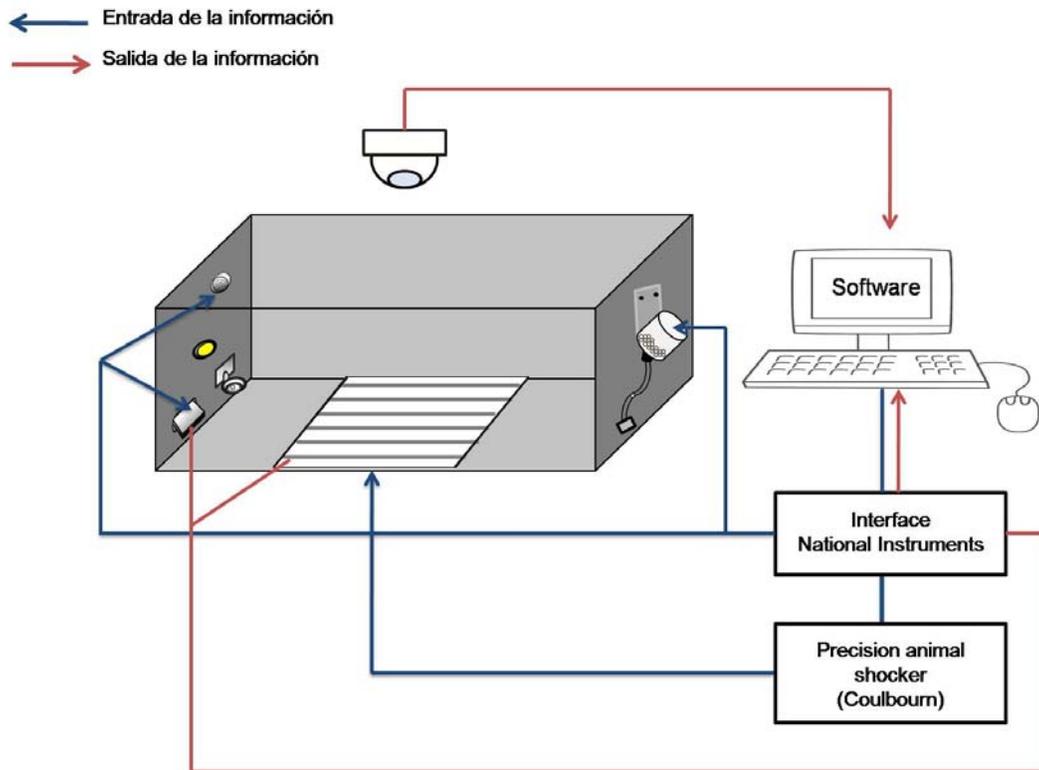


Figura 3.2. Diagrama de flujo de la automatización del equipo de inhibición activa del miedo en busca de recompensas. Se muestra la entrada (presentación de estímulos) y salida (respuestas conductuales) de información controlada y procesada mediante un programa para computadora personal, desarrollada a partir de una tarjeta de adquisición de datos National Instruments.

Los parámetros de presentación de los estímulos que podemos controlar son los siguientes: intensidad y duración de los estímulos auditivos, duración y número de repeticiones de la descarga eléctrica (a través del equipo de Coulbourn en donde se controla la intensidad en miliamperios), duración de los

estímulos visuales (indicador de luz y LED rojo), número de pellets entregados y número de palanqueos necesarios para entregar los pellets.

El registro de las diferentes respuestas conductuales que podemos procesar son las siguientes: cantidad de palanqueos dados en un tiempo específico, tiempo exacto de desplazamiento de una zona segura a otra (interrupción de haces infrarrojos) y tiempo exacto de palanqueo entre ambas palancas.

Además del registro de las diferentes respuestas conductuales ya mencionadas, el equipo cuenta con un registro de video digital, el cual es procesado directamente desde la computadora personal (para mas detalles ver sección 3.1.4)

3.1.3 Software MATLAB

El control del equipo mediante la aplicación de MATLAB (versión R2011a), se llevó a cabo mediante el desarrollo de códigos específicos para presentar los estímulos y registrar diferentes respuestas conductuales. Durante los experimentos desarrollados para estandarizar la tarea conductual, los códigos fueron constantemente actualizados y modificados conforme a las necesidades de los entrenamientos (ver sección de resultados).

Hacia el final de los experimentos, fueron necesarios al menos 5 entrenamientos conductuales con diferentes parámetros de presentación de los estímulos para evaluar la inhibición activa del miedo. Cada entrenamiento conductual se desarrolló y presentó a través de 5 pantallas principales. Un ejemplo de una de las pantallas de entrenamiento se muestra en la figura 3.3. Cada pantalla de entrenamiento fue diseñada para introducir los diferentes parámetros de presentación de los estímulos y para visualizar los datos numéricos de las respuestas conductuales. Así mismo, se diseñaron con la opción de introducir el tiempo exacto de duración de una sesión de entrenamiento y tiempo de habituación.

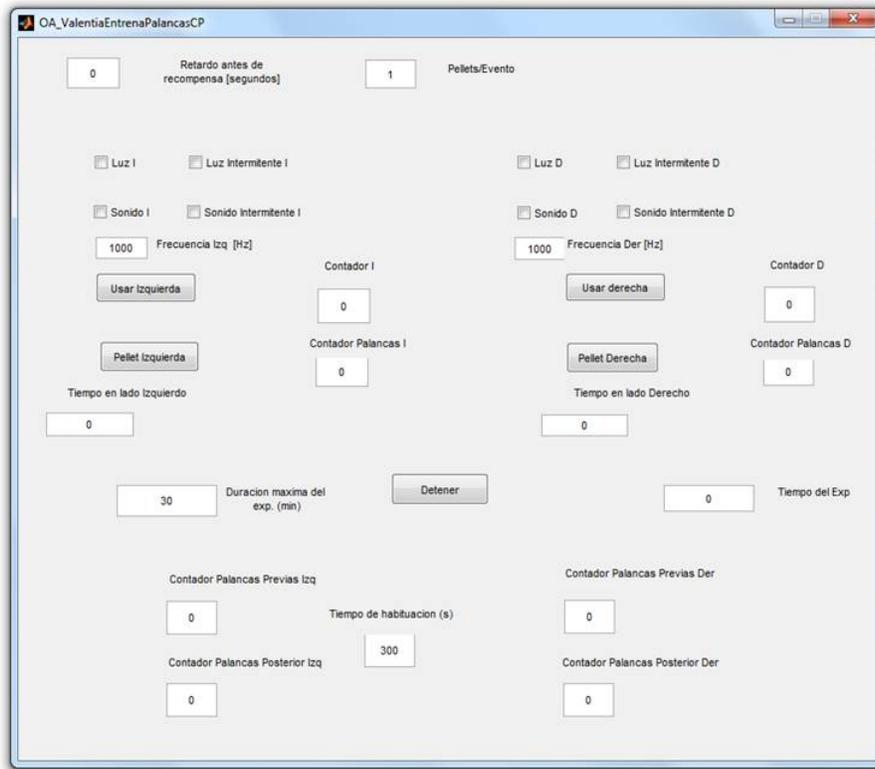


Figura 3.3. Control del equipo mediante el Software MATLAB. Se muestra una pantalla de entrenamiento de la aplicación MATLAB para controlar la caja de entrenamiento de inhibición activa del miedo en busca de recompensas. La pantalla muestra el entrenamiento de palanqueo, dividido en lado izquierdo y derecho; para controlar de manera independiente ambas zonas seguras de la caja de entrenamiento. Los estímulos y el registro de las respuestas conductuales se muestran para ambos lados (izquierdo y derecho). El lado a utilizar puede ser elegido mediante un botón (usar izquierda, usar derecha) ubicado para cada lado de la ventana de entrenamiento. Las casillas vacías (izquierda y derecha) tienen la función de activar o desactivar la presentación de los diferentes estímulos (luz y sonido). Los recuadros en blanco (izquierda y derecha) con el valor numérico cero, muestran los registros numéricos de la respuesta conductual de palanqueo. Así mismo, muestran el valor numérico de diferentes parámetros como el tiempo de duración de una sesión de entrenamiento, tiempo transcurrido para cada lado, número de reforzadores (pellets) por palanqueo, frecuencia del estímulo auditivo, y el retardo de la entrega de los reforzadores. La entrega de pellets y la finalización del entrenamiento de manera manual, puede ser activada mediante un botón (dar pellet-detener) diseñado para cada fin.

El inicio (estímulos apagados) y finalización (estímulos apagados) de los entrenamientos se llevaron a cabo de manera manual y automática. Sólo un entrenamiento conductual fue diseñado para que el almacenamiento de los datos fuera de manera automática. En los otros entrenamientos, fue necesario el registro manual de los datos directamente desde la aplicación de MATLAB. En caso de que los datos fueran almacenados automáticamente, éstos se guardaron en una matriz diseñada desde la aplicación de MATLAB, de donde fueron extraídos y exportados para su análisis posterior.

3.1.4 Video

Toda la conducta de los animales fue grabada mediante una cámara de video digital (Provision, modelo D-380D5), colocada en la parte superior de la caja de entrenamiento. La cámara se conectó directamente a la computadora personal mediante un dispositivo USB. Para la visualización y almacenamiento de los videos se utilizó el programa ANY-Maze.

3.1.5 Software KRISA

Para mejorar la implementación del equipo de inhibición activa del miedo en busca de recompensas, se desarrolló un software nuevo (Knowledge Recollection Intelligent System Accuracy, KRISA) para el control y automatización de la caja de entrenamiento. El software KRISA se desarrolló con la colaboración del Laboratorio Nacional de Informática Avanzada A.C. (LANIA). Fue diseñado para operar en una computadora personal, a través de la tarjeta de adquisición de datos National Instruments. A continuación, se describen algunas de las ventajas adquiridas para operar el equipo conductual mediante el desarrollo del programa KRISA:

La aplicación de KRISA se diseñó para que la entrada y salida de información del equipo pudiera ser controlada y procesada desde una sola ventana principal. La ventana principal contiene 5 pestañas que corresponden a los 5 entrenamientos necesarios para la conducta de inhibición activa del miedo (Figura 3.4). Cada entrenamiento está dividido entre parámetros de entrada (parámetros de presentación de los estímulos) y parámetros de salida (registro de las respuestas conductuales) de manera independiente.

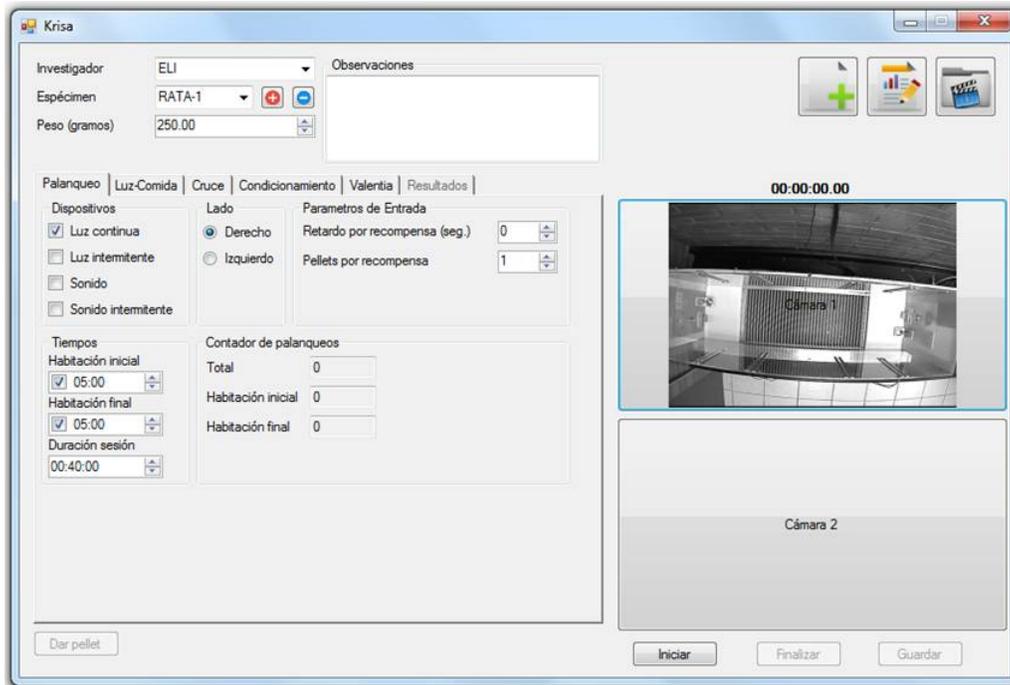


Figura 3.4. Control del equipo mediante Software KRISA. Se muestra la pantalla principal de la aplicación KRISA para controlar la caja de entrenamiento de inhibición activa del miedo en busca de recompensas. La pantalla principal está dividida en 4 secciones: Una sección para introducir datos relevantes de un experimento (Investigador, peso de los animales y observaciones), una sección de control de cámaras de videos, una sección con botones de navegación (botón para iniciar una nueva sesión, botón para generar reportes, botón para almacenamiento de los videos) y una última sección con 5 pestañas de entrenamientos. La pestaña del entrenamiento que aquí se muestra (palanqueo) está dividido en 5 partes: Dispositivos, en donde se pueden activar o desactivar la presentación de estímulos (luz y sonido). Lado, para seleccionar la zona que se utilizara. Parámetros de entrada, en donde seleccionamos el número de reforzadores por palanqueo (pellets) y el retardo de éstos. Tiempos, en donde seleccionamos la duración máxima que tendrá una sesión de entrenamiento así como el tiempo de duración de habituación inicial y final. Contadores, en donde se registra el valor numérico de la respuesta conductual de palanqueo; tanto en el entrenamiento como en las habituaciones. La entrega manual de pellets puede ser activado mediante un botón diseñado para este fin (botón dar pellet). Botones para controlar la sesión de entrenamiento (iniciar, finalizar y guardar) se ubican en la parte inferior de la ventana principal, los cuales, nos permiten iniciar el entrenamiento, finalizar de manera manual el entrenamiento y el almacenamiento interno de los datos del entrenamiento.

Desde la ventana principal se pueden introducir los datos relevantes de un experimento, como el nombre del investigador, datos de las ratas (alias y peso) y observaciones. Estos datos quedan registrados para todos los entrenamientos y pueden ser almacenados de manera automática. Se incluyó el tiempo límite de duración de los entrenamientos y el tiempo límite de duración de periodos de habituación inicial y final. Al terminarse el tiempo de habituación registrado, el equipo comienza a correr automáticamente el entrenamiento. Al finalizarse el tiempo de entrenamiento registrado, el programa termina el entrenamiento automáticamente y comienza inmediatamente con el periodo de habituación final. Un cronómetro de toda la sesión de entrenamiento, fue programado desde la pantalla principal.

Al término de una sesión de entrenamiento, ésta puede guardarse de manera automática en una base de datos conectada al sistema. De manera automática se pueden generar reportes de las sesiones de entrenamiento en un archivo de Excel, a partir de la exportación de datos de cada entrenamiento. Los datos se exportan a partir del nombre del investigador, el tipo de entrenamiento y la fecha de realización del entrenamiento. De este modo, la generación de los reportes se realiza de manera específica y automática; sin la posibilidad de confundir los datos.

Los reportes generados son guardados fuera del sistema de KRISA y contienen la siguiente información: datos de la sesión (nombre del investigador, datos de los animales, tipo de entrenamiento, fecha y hora del entrenamiento y observaciones), parámetros utilizados para el entrenamiento y resultados (datos numéricos de las respuesta conductuales). Por último, se incorporó el control de dos cámaras de video dentro de la aplicación del KRISA, lo cual, incluye la visualización, iniciación, finalización y almacenamiento de los videos desde la pantalla principal de cada entrenamiento. El almacenamiento de los videos se realiza de manera independiente a las sesiones de entrenamiento y bajo un formato Windows Media Player.

3.2 Entrenamiento de palanqueo

3.2.1 Sujetos

Se utilizaron 23 ratas macho de la cepa Wistar, adquiridas en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, con una edad de 3 meses y con un peso inicial de 250 a 280 gramos. Los animales se mantuvieron en cajas individuales de acrílico, localizadas en un cuarto con temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) y con una humedad relativa del 40 al 79%. Todas las ratas estuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 horas y con libre acceso a agua.

Las 23 ratas se dividieron en 3 diferentes experimentos para ser utilizadas de manera independiente de la siguiente manera: 4 ratas fueron utilizadas para el experimento 1, 6 ratas para el experimento 2 y 13 ratas para el experimento 3. En el capítulo 4 (resultados) se explicara en qué consistieron cada uno de los experimentos y sus respectivos entrenamientos.

3.2.2 Restricción de alimento

Debido a que utilizamos comida (pellets de 45 mg) como recompensa, los animales se mantuvieron al 85% de su peso inicial. Por lo cual, al ingresar al vivarium, fueron pesados y privados de alimento (dieta comercial en pellets para roedores de mantenimiento) durante 24 horas. De acuerdo al peso inicial de cada animal, se calculó el 85% de éste y ese peso se tomó como el peso final de mantenimiento para cada animal. A continuación, durante los siguientes 6 días, se restringió el alimento a 2 pellets (12 gramos) por día; hasta que los animales llegaron a su peso final. El peso final (85% del peso inicial) se mantuvo a lo largo de los experimentos, que duraron aproximadamente de 8 a 9 semanas. Todos los días, los animales fueron pesados para evaluar la pérdida eventual de peso y el mantenimiento del peso final.

3.2.3 Moldeamiento

Una vez que los animales llegaron al 85% de su peso inicial, todos los experimentos iniciaron con un entrenamiento de palanqueo. El entrenamiento de palanqueo consistió en enseñarles a los animales a presionar una palanca por comida, a través de un moldeamiento. El moldeamiento es un tipo de entrenamiento que consiste en reforzar las aproximaciones sucesivas a una conducta específica que aún no existe en el repertorio conductual de un organismo. En nuestro caso, el moldeamiento consistió en reforzar con un pellet todas las aproximaciones sucesivas que se asemejaron a la conducta del palanqueo.

3.2.4 Entrenamiento

El entrenamiento de palanqueo se realizó durante 4 días, utilizando una de las zonas seguras de la caja de entrenamiento. Se colocó un acrílico oscuro en el borde de la zona segura, para evitar que los animales accedieran a otras zonas de la caja de entrenamiento y se realizó lo siguiente:

Día 1 y 2 (moldeamiento): Antes de iniciar el moldeamiento, se colocaron 4 pellets húmedos en el comedero de alguna de las zonas seguras de la caja de entrenamiento. A continuación, los animales fueron colocados en esa misma zona segura, con las luces apagadas. Se permitió que durante 5 minutos (habituación) los animales exploraran la zona segura y se comieran los pellets. Al término de los 5 minutos, una luz continua amarilla se prendió y comenzó el moldeamiento. Si los animales no habían consumido los pellets aún, se esperó el tiempo necesario hasta que los consumieran; con las luces encendidas. De manera manual, se activó el dispensador de pellets para que cayera un pellet en el comedero. Esto se realizó de manera constante durante aproximadamente 10 minutos. El ruido del dispensador de pellets seguido de la liberación de éste, nos permitió que las ratas asociaran este ruido con la disponibilidad de comida. Por lo que, siempre que escucharon el ruido del dispensador de pellets, los animales se acercaron y mantuvieron cerca del comedero y de la palanca.

Se reforzó a los animales con un pellet sólo si realizaban alguna conducta cercana al palanqueo, como pararse en dos patas frente a la palanca, olfatear cerca de la palanca ó incluso morder la palanca. Mientras que, evitamos reforzar aquellas conductas realizadas lejos de la zona de la palanca y el comedero, como acicalarse en alguna esquina de la zona segura. Esto se realizó hasta que los animales por ensayo y error, aprendieron a presionar la palanca por sí solos o hasta que trascurrieran 30 minutos de entrenamiento.

Día 3 y 4 (entrenamiento): Después del moldeamiento, se permitió que los animales presionaran la palanca por comida bajo un programa de reforzamiento razón fija 1 (RF1); con una relación de 1 pellet por palanqueo. Se estableció como criterio de entrenamiento que los animales tuvieran al menos dos días de entrenamiento bajo el programa -RF1- y que durante estos dos días obtuvieran como mínimo 150 reforzadores. Durante todo el entrenamiento de palanqueo las zonas seguras se alternaron para que los animales se habituaran y aprendieran a presionar la palanca en ambas zonas seguras.

El entrenamiento de palanqueo y todos los entrenamientos realizados para estandarizar la conducta de inhibición activa del miedo en busca de recompensas (ver capítulo de resultados), fueron realizados de lunes a viernes; en un horario de 9:00 am a 16:00 pm. Los entrenamientos tuvieron una duración máxima de 40 minutos, contando con 5 minutos de habituación inicial y 5 minutos de habituación final con todos los estímulos apagados. Una vez que terminaba el entrenamiento, los animales fueron retirados de la caja de entrenamiento y colocados en su caja hogar y regresados al cuarto del vivarium. Después de cada entrenamiento, se alimentó a los animales con 15 gramos de pellets diarios.

3.2.5 Análisis de datos:

Los resultados obtenidos en los entrenamientos realizados para evaluar la inhibición activa del miedo en busca de recompensas, fueron extraídos de la interface MATLAB y fueron procesados y ordenados en una hoja de cálculo de Microsoft Office Excel 2007. Todas las gráficas presentadas en este trabajo se realizaron mediante el programa Graph-Pad Prism versión 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), mientras que el análisis estadístico se realizó con el software especializado STATISTICA (StatSoft, versión 10). En el programa de estadística realizamos pruebas t de Student (muestras pareadas) para comparaciones simples, y análisis de varianzas (ANOVA) de una y dos vías (medidas repetidas) con una prueba post hoc Tukey para comparaciones múltiples.

CAPITULO IV

RESULTADOS

El objetivo de este proyecto fue desarrollar la primera tarea conductual para estudiar la inhibición activa del miedo en busca de recompensas. Para lograr este objetivo, se diseñó una tarea conductual en la cual, creando un conflicto de motivaciones aversivas y apetitivas, se desafiaron a los animales a enfrentar activamente un peligro para poder obtener una recompensa.

La tarea conductual consistió en entrenar a los animales a cruzar por comida en condiciones peligrosas, en donde una descarga eléctrica estuvo presente (ensayos peligrosos) y en condiciones seguras en donde no se presentó la descarga eléctrica (ensayos seguros). En ambas condiciones, se utilizó un estímulo ambiental para señalar si cruzar por comida sería peligroso o seguro. De manera automática se registró el tiempo en que los animales tardaron en cruzar (latencias de cruces) y el tiempo en que tardaron en desplazarse en condiciones seguras y peligrosas. Latencias de cruces y desplazamientos mayores en ensayos peligrosos que en los ensayos seguros, se analizaron como una medida de la inhibición activa del miedo para obtener una recompensa. Para lograr esta diferencia de latencias de cruce (medidas en seg) en ensayos seguros y peligrosos, fue necesario entrenar a los animales en cuatro importantes etapas conductuales:

I. Entrenamiento apetitivo-seguro: El objetivo de este entrenamiento consistió en enseñar a los animales a asociar un estímulo ambiental con una consecuencia apetitiva (pellets de 45 mg). De modo que, la presencia de este estímulo señaló la disponibilidad de comida en cualquier zona segura de la caja de entrenamiento. La comida pudo ser obtenida por los animales sólo si presionaban una palanca. Los acercamientos a la palanca, señalados por el estímulo apetitivo, se utilizaron como un indicativo del impulso apetitivo de los animales por la recompensa.

II. Entrenamiento aversivo-peligroso: El objetivo de este entrenamiento consistió en enseñar a los animales a asociar un estímulo ambiental con una consecuencia aversiva (descarga eléctrica). De modo que, la presencia de este estímulo señaló la presencia de una descarga eléctrica. El tiempo en que los animales permanecieron inmóviles ante la señal aversiva se utilizó como un indicativo del impulso del miedo ante la señal.

III. Entrenamiento de discriminación: Consistió en enseñar a los animales a distinguir entre condiciones seguras (ensayos seguros) y peligrosas (ensayos peligrosos) para obtener comida. Los ensayos seguros fueron señalados por el estímulo apetitivo, y los ensayos peligrosos por el estímulo aversivo y la presencia de la descarga eléctrica. Se midió el tiempo en que los animales tardaron en cruzar y presionar una palanca por comida (latencias de cruces) en ambos tipos de ensayos. De modo que, el impulso apetitivo por la recompensa se evaluó mediante las latencias de cruces en los ensayos seguros, mientras que, el conflicto motivacional entre el impulso apetitivo y el impulso de miedo ante el peligro, se evaluó mediante las latencias de cruces en ensayos peligrosos.

Diferencias significativas de latencias de cruces en ensayos peligrosos comparados con los ensayos seguros, se utilizaron como criterio de discriminación para evaluar la inhibición activa del miedo en los ensayos peligrosos. Cuando el criterio de discriminación se cumplió se realizó una prueba de inhibición activa del miedo.

IV. Prueba de inhibición activa del miedo en busca de recompensas: Sólo las señales aversivas y apetitivas se utilizaron para indicar a los animales si cruzar por comida fue seguro o peligroso. Las latencias de cruces mayores en ensayos peligrosos comparados con los ensayos seguros, se utilizaron como una medida de la inhibición activa del miedo para obtener una recompensa.

Siguiendo estas cuatro etapas conductuales, fue necesario realizar varios experimentos con diferentes parámetros y entrenamientos; para poder evaluar la inhibición activa del miedo. A continuación, se describirán los

experimentos que nos permitieron estandarizar la tarea de inhibición activa del miedo para obtener una recompensa.

4.1 Experimento 1

4.1.1 Objetivo

Entrenar a los animales a discriminar entre una luz continua como señal segura (ensayos seguros) y una luz intermitente como señal peligrosa (ensayos peligrosos) para poder evaluar la inhibición activa del miedo.

4.1.2 Procedimiento

Para lograr que los animales aprendieran a discriminar entre ensayos seguros y peligrosos, fue necesario entrenarlos en las siguientes etapas conductuales:

I. Entrenamiento apetitivo-seguro

Animales capacitados previamente a presionar una palanca por comida (entrenamiento de palanqueo), fueron colocados en una de las zonas seguras de la caja de entrenamiento y entrenados a cruzar de una zona segura a otra en busca de comida. Se utilizó una luz continua (señal apetitiva) para señalar la zona segura de la caja en dónde estaría disponible la comida si los animales presionaban la palanca.

Para evitar que las ratas cruzaran de manera azarosa, se programó el equipo para que la presencia de la luz continua se repitiera 3 veces en el mismo lado de la caja de manera aleatoria. De este modo, nos aseguramos de que los animales cruzaran sólo por la presencia de la luz continua. Durante siete días se entrenaron a las ratas y por cada día de entrenamiento se les permitió realizar 30 ensayos de cruce, con una duración máxima de 180 segundos. Si los animales cruzaron y presionaron la palanca antes de cumplirse este periodo de tiempo, se les entregó un pellet como recompensa.

En todos los ensayos de cruce se registró de manera automática el tiempo, en segundos, que tardaron los animales en cruzar de una zona segura a otra y presionar la palanca por comida (Latencias de cruces), así como el

tiempo que tardaron sólo en desplazarse de una zona segura a otra (Desplazamientos).

La figura 4.1A muestra el promedio y error estándar (SEM) de las latencias de cruces y los desplazamientos, obtenidos a lo largo del entrenamiento (D1-D7). Se encontró que, al inicio del entrenamiento (D1) los animales tardaron en promedio 15 segundos en cruzar por comida y presionar la palanca, mientras que, en desplazarse tardaron sólo 11 segundos.

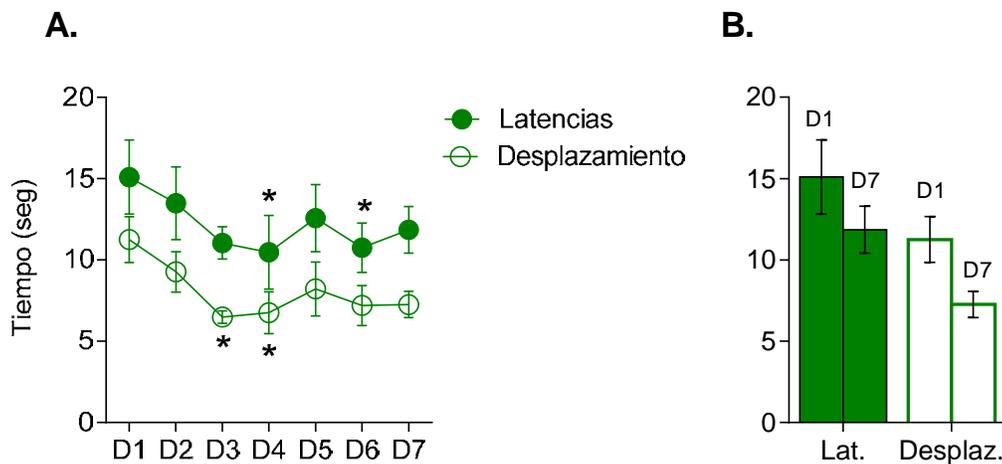


Figura 4.1. Entrenamiento apetitivo-seguro (n=4). **A)** La gráfica muestra el promedio y error estándar (SEM) del tiempo transcurrido en las latencias de cruces y desplazamientos en los ensayos indicados por la luz continua, a lo largo del entrenamiento (D1-D7). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas de las latencias de cruces y los desplazamientos a través del tiempo; $p=0.000$, pero no así en su interacción; $p=0.99$. Una prueba Post Hoc, encontró que el primer día de entrenamiento (D1) difirió significativamente al ser comparado sólo con el cuarto (D4, $*p=0.0145$) y sexto (D6, $*p=0.0282$) día de entrenamiento, en las latencias de cruces. Mientras que, en el desplazamiento se encontraron diferencias significativas del primer día de entrenamiento (D1) comparado sólo en el tercer (D3, $*p=0.0107$) y cuarto día (D4, $*p=0.0197$) de entrenamiento. **B)** Resumen del entrenamiento apetitivo-seguro. La gráfica muestra el tiempo (seg) de las latencias de cruces comparadas con el tiempo (seg) de los desplazamientos de los ensayos de cruces; durante el primer (D1) y último (D7) día de entrenamiento. Lat: latencia, Desplaz: desplazamientos.

En las latencias de cruces como en los desplazamientos se observó una disminución del tiempo conforme avanzaron los días de entrenamiento, como puede apreciarse en el cuarto día de entrenamiento (D4) cuyas latencias de cruces fueron de 10.5 segundos y desplazamientos de 7 segundos. Un ligero incremento del tiempo de desplazamiento y de las latencias de cruces se observó durante el quinto día de entrenamiento (D5, latencias de cruces= 13 segundos; desplazamientos= 8.5 segundos), sin embargo, estas volvieron a disminuir hacia el final del entrenamiento como puede observarse en el sexto y séptimo día de entrenamiento (D6, latencias de cruces= 10.8 segundos, desplazamientos= 7 segundos; D7, latencias de cruces =11.8 segundos, desplazamientos= 7 segundos).

Durante todos los días de entrenamiento observamos que el tiempo en que tardaron los animales en presionar la palanca por comida, después de haberse desplazado, fue de 4 segundos. Estas diferencias entre el desplazamiento y las latencias de cruces no resultaron ser estadísticamente significativas, ANOVA (2 vías) de medidas repetidas (F de interacción $(6,36) = .134$, $p=0.99$); sugiriéndonos que, después del desplazamiento lo primero que hacen los animales es presionar la palanca para obtener la recompensa. Sin embargo, sí encontramos diferencias estadísticamente significativas en las latencias de cruces y los desplazamientos con respecto al tiempo (D1-D7); $F_{(6,36)} = 8.63$; $p = 0.000$. Mediante una prueba Post Hoc (Tukey HSD) se observó que las latencias de cruces sólo del primer día de entrenamiento (D1, 15 segundos) difirió significativamente del cuarto (D4, 10.5 segundos, $p=0.0145$), y sexto día de entrenamiento (D6, 10.8 segundos, $p=0.0282$). Para el desplazamiento se encontraron diferencias significativas en el primer día de entrenamiento (D1, 6.5 segundos) comparado con el tercer (D3, 6.4 segundos, $p=0.0107$) y cuarto día (D4, 6.7 segundos, $p=0.0197$) de entrenamiento.

Los resultados obtenidos, mediante este análisis, sugieren que después de 7 días de entrenamiento los animales aprendieron a asociar la luz continua como una señal apetitiva. Lo cual, se ve reflejado en la disminución del tiempo en las latencias de cruces (Lat.) y en los desplazamientos (Desplaz.) del

primer día de entrenamiento (D1) comparado con el último día (D7) como puede apreciarse en la figura 4.1B.

II. Entrenamiento aversivo-peligroso

Después de que los animales aprendieron a cruzar para obtener comida, guiadas por la luz continua (señal apetitiva), se realizó un condicionamiento al miedo para que los animales asociaran un estímulo visual con una consecuencia aversiva. Para realizar el condicionamiento al miedo, se utilizó una luz intermitente como EC y una descarga eléctrica como EI.

Durante un día, los animales fueron colocados y restringidos a la zona de la parrilla (zona peligrosa) de la caja de entrenamiento. A continuación, después de un periodo de habituación de 5 minutos, una luz intermitente (EC) se presentó durante 30 segundos; seguida de una descarga eléctrica (EI) de 0.8 mA de intensidad, durante 0.5 segundos. La presentación de la luz intermitente seguida de la descarga eléctrica (EC-EI) se repitió 5 veces con un intervalo de presentación mínimo de 60 segundos y máximo 180 segundos.

Veinticuatro horas después del condicionamiento al miedo, se realizó una prueba para evaluar el aprendizaje de la asociación EC-EI. Para la prueba se presentaron 2 repeticiones del EC separadas por un intervalo de 60 a 180 segundos. El desempeño de los animales, durante la adquisición del condicionamiento, se evaluó midiendo el tiempo en que permanecieron inmóviles durante los 5 minutos de habituación y 60 segundos después de haber presentado la relación EC-EI.

La Figura 2.A muestra la adquisición del condicionamiento al miedo, se graficó el promedio y error estándar (SEM) del porcentaje de inmovilización durante la habituación (PRE) y después de haber presentado la luz intermitente y la descarga eléctrica (EC-EI), a través del tiempo (5 presentaciones). Observamos que el porcentaje de inmovilización durante la habituación fue menor del 5%. Este porcentaje de inmovilización no difirió de las 4 primeras presentaciones del EC-EI. Fue hasta la última presentación del EC-EI en

donde los animales mostraron mayor porcentaje de inmovilización (16%). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de inmovilización comparado con la habituación y las 5 presentaciones del EC-EI; ANOVA (1 vías) de medidas repetidas, $F_{(5,15)} = .37$, $p = .857$.

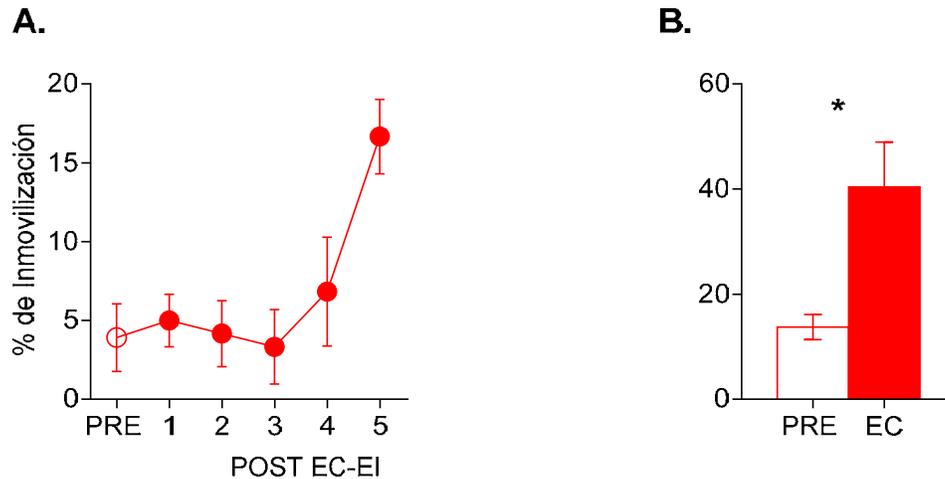


Figura 4.2. Entrenamiento aversivo-peligroso (n=4). **A)** Adquisición del condicionamiento al miedo. La grafica muestra el promedio y error estándar (SEM) del porcentaje de inmovilización durante la habituación (PRE) y después de haber presentado la relación EC-EI durante 5 repeticiones (1-5). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de inmovilización durante la habituación (PRE) ni en las 5 presentaciones del EC-EI; $p = .857$. **B)** Prueba del Condicionamiento al miedo. Se muestra el promedio y error estándar (SEM) del porcentaje de inmovilización ante la ausencia del EC (PRE) y durante la presencia del EC. Una prueba t de Student para muestras pareadas, mostró diferencias significativas al comparar el porcentaje de inmovilización ante la presencia y ausencia de la luz intermitente; * $p = 0.0326$.

Para la prueba del condicionamiento al miedo, se midió el tiempo en que los animales permanecieron inmóviles durante los 5 minutos de habituación y durante los 30 segundos de presentación de la luz intermitente. La figura 2.B, muestra el promedio y error estándar (SEM) del porcentaje de inmovilización durante la presentación del EC y durante la habituación (PRE). Como puede observarse, los animales tuvieron mayor porcentaje de inmovilización (40%) durante la presencia de la luz intermitente que en ausencia de esta (14%);

estas diferencias fueron estadísticamente significativas, según lo encontrado en una prueba *t* de Student para muestras pareadas; $t_{(3)}=3.77$, $p=0.0326$.

Los resultados encontrados durante este entrenamiento sugieren que, a pesar de que los animales no tuvieron diferencias significativas en el porcentaje de inmovilización durante la adquisición del condicionamiento al miedo (Figura 2.A), los animales aprendieron a asociar la luz intermitente como una señal aversiva. Lo cual, se ve reflejado en un mayor porcentaje de inmovilización ante la presencia de la luz intermitente comparado con el porcentaje de inmovilización obtenido en ausencia de ésta (habitación), durante la prueba del condicionamiento al miedo (Figura 2.B).

III. Entrenamiento de discriminación

Una vez que los animales fueron entrenados a asociar la luz continua con la disponibilidad de comida (entrenamiento apetitivo) y la luz intermitente con la presencia de la descarga eléctrica (entrenamiento aversivo), comenzó el entrenamiento de discriminación. Para este entrenamiento, los animales fueron colocados en una de las zonas seguras de la caja de entrenamiento y de manera aleatoria se les presentó ensayos seguros y peligrosos; distribuidos en una sesión de 30 ensayos de cruces.

Los ensayos seguros fueron señalizados por la luz continua, mientras que, los ensayos peligrosos fueron indicados por la luz intermitente y por la presencia de una descarga eléctrica. La intensidad de la descarga eléctrica fue de 0.6 mA y la probabilidad de aparición de ensayos peligrosos (% de riesgo) se estableció en un porcentaje del 10 y 30%, conforme a los días de entrenamiento.

Para ambos ensayos se programó una duración máxima de 180 segundos, si los animales cruzaron y presionaron la palanca antes de cumplirse este periodo de tiempo se entregó un pellet para ambas condiciones; de no haber cruzado antes de los 180 segundos todos los estímulos (luces, y descarga eléctrica) se apagaron y comenzó un nuevo ensayo.

Todos los días se registró el tiempo en que los animales tardaron en cruzar hacia las zonas seguras y presionar la palanca (latencias de cruces) y el tiempo que tardaron en desplazarse (desplazamientos), en ensayos seguros y ensayos peligrosos. Para el análisis de los datos sólo se tomó en cuenta el tiempo de latencias de cruces para ambos ensayos, debido a que en el entrenamiento apetitivo-seguro no se encontraron diferencias significativas entre las latencias de cruces y los desplazamientos.

Para determinar que los animales habían aprendido a discriminar y poder realizar la prueba de inhibición activa del miedo en busca de recompensas, se acordó un criterio de discriminación de $p < 0.05$ al comparar las diferencias en latencias de cruces en ensayos seguros versus los ensayos peligrosos. Cada día de entrenamiento se evaluó el criterio de discriminación para poder pasar a la prueba de inhibición activa del miedo.

La figura 4.3A muestra el promedio y error estándar (SEM) de latencias de cruces (seg) a través del tiempo (D1-D7). De los 30 ensayos de cruce, sólo se graficó y analizó el primer bloque de 10 ensayos distribuidos en ensayos seguros y peligrosos. De modo que, para los ensayos seguros se tomaron los primeros 7 ensayos de cruce, de los 27 (10% de riesgo) o 21 (30% de riesgo) ensayos disponibles. Mientras que, para los ensayos peligrosos se tomaron sólo los primeros 3 ensayos de cruce, de los 3 (10%) o 9 (30%) ensayos disponibles. El porcentaje de riesgo para los ensayos peligrosos se muestra en su respectivo día de entrenamiento (10% en D1 y D2; 30% en D3-D7).

Se encontró que, durante la primera sesión de entrenamiento (D1) los animales tuvieron latencias de cruces similares en ensayos seguros (27.3 seg) y peligrosos (25.5 seg). Después de aumentar el porcentaje de riesgo de un 10 a un 30% en días posteriores (D4, D5 y D6), se observó una ligera tendencia de latencias de cruces mayores en ensayos peligrosos (D4=81 seg, D5= 80.2 seg y D6= 75.70 seg) que en los ensayos seguros (D4=67.81 seg, D5= 63 seg y D6= 59 seg). Sin embargo en el último día de entrenamiento (D7) los animales tardaron el mismo tiempo en cruzar por comida en ambos tipos de ensayos (ensayos seguros= 64.78 seg; ensayos peligrosos=61.98 seg).

Las diferencias encontradas a lo largo del entrenamiento en las latencias de cruces para ambos ensayos, no resultaron ser estadísticamente significativas; ANOVA de medidas repetidas (2 vías), $F_{(6,36)} = .197$, $p=0.975$. Al evaluar el criterio de discriminación en el último día de entrenamiento (D7), tampoco se encontraron diferencias significativas al comparar el promedio de latencias de cruces (seg) en ensayos seguros versus ensayos peligrosos; prueba t de Students para muestras pareadas, $t_{(3)} = 0.39$, $p=0.715$ (Figura 4.3B).

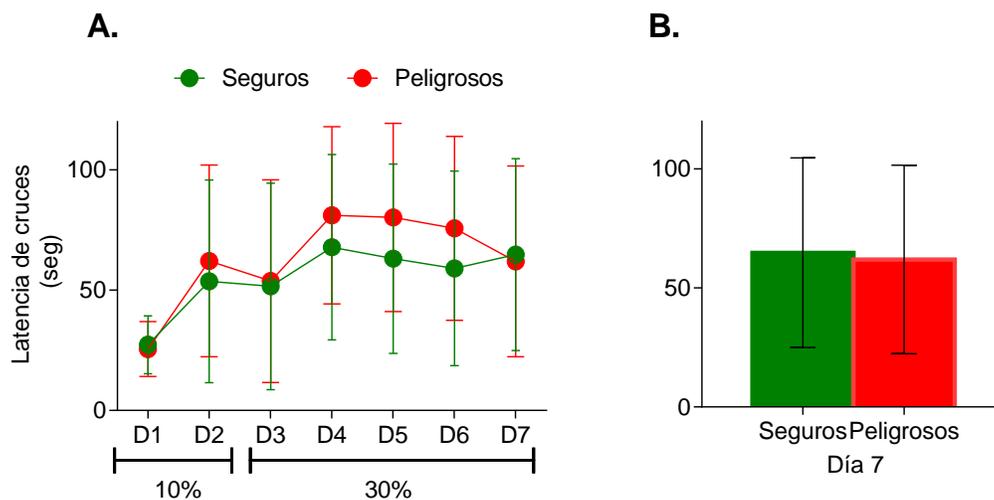


Figura 4.3. Entrenamiento de discriminación (n=4). **A)** Se muestra el promedio y error estándar de las latencias de cruces (seg) en ensayos seguros y ensayos peligrosos a través del tiempo (D1-D7) y su respectivo porcentaje de riesgo utilizado para entrenar a los animales; (10% en D1 y D2; 30% en D3-D7). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el tiempo en que los animales tardaron en cruzar y presionar la palanca por comida en ensayos seguros y peligrosos, con respecto al tiempo; $p=0.975$. **B)** Comparación de las latencias de cruces (seg) en ensayos seguros versus ensayos peligrosos de la última sesión de entrenamiento (D7). El tiempo que tardaron los animales en cruzar y presionar la palanca por comida no fue significativamente diferente en ensayos seguros versus los ensayos peligrosos; $p=0.715$. Por lo que, no se cumplió el criterio de discriminación para realizar la prueba de inhibición activa del miedo.

Los resultados obtenidos en este entrenamiento sugieren que los animales no aprendieron a discriminar entre la luz continua como una señal segura, ni la luz intermitente como una señal aversiva para indicar el momento en que fue seguro o peligroso cruzar por comida. Lo cual se ve reflejado en

las latencias de cruces similares obtenidas en ambos ensayos en la mayoría de los días de entrenamiento. Por tal motivo, fue imposible que en este primer experimento se realizara y evaluara la prueba de inhibición activa del miedo.

4.1.3 Discusión experimento 1

En este experimento no conseguimos que los animales discriminaran entre una luz continua como señal apetitiva y una luz intermitente como señal aversiva para indicar en qué momento fue seguro o peligroso cruzar por comida. Por lo que, el criterio de discriminación establecido de $p < 0.05$ no se cumplió (Figura 4.3B) y la prueba de inhibición activa del miedo no se realizó.

Los resultados encontrados en este entrenamiento, sugieren que las diferencias perceptuales entre la luz continua y la luz intermitente no fueron lo percibidas por los animales como dos señales distintas y con diferentes propiedades apetitivas y aversivas al ser presentadas al mismo tiempo. Es decir, es posible que los animales detectaran ambos estímulos visuales como una misma señal aversiva; lo cual podría explicar por qué tuvieron latencias de cruces altas tanto en ensayos peligrosos como en ensayos seguros.

Detectamos también que, tanto en el entrenamiento apetitivo como en el aversivo era necesario mejorar la asociación de los estímulos ambientales con sus consecuencias apetitivas y aversivas. Durante el condicionamiento al miedo encontramos que, a pesar de que los animales se inmovilizaron significativamente sólo ante la presencia de la luz intermitente (Figura 4.2B), el porcentaje de inmovilización fue bajo (40% del 100% total del tiempo de presentación de la luz intermitente) considerando la alta intensidad alta descarga eléctrica utilizada (0.8 mA). Observamos que al presentar el EC durante la prueba del condicionamiento la mayoría de los animales presentaron mucha más conducta de escape que de inmovilidad, lo cual sin duda afectó el porcentaje de inmovilización.

En cuanto al entrenamiento de la señal apetitiva, a pesar de que los animales cruzaron guiándose por la luz continua y que el tiempo en que tardaron los animales en cruzar (latencias de cruces) y desplazarse (desplazamientos) fue disminuyendo significativamente conforme avanzaron

los días de entrenamiento; observamos que la conducta de los animales tuvo mucha variabilidad, y que se necesitaron demasiados días de entrenamiento (7 días) para lograr que los animales bajaran sólo 3 segundos de las latencias de cruces registradas al inicio del entrenamiento (15 segundos) con respecto al último día de entrenamiento (12 segundos). Por tal motivo, para mejorar el entrenamiento de los animales y evaluar inhibición activa del miedo, se realizó un segundo experimento en donde cambiamos varios parámetros y agregamos nuevas etapas conductuales, que se describirán a continuación.

4.2 Experimento 2

4.2.1 Resumen

Durante el primer experimento realizado para estandarizar la tarea de inhibición activa del miedo, encontramos que los animales no aprendieron a discriminar entre una luz continua como señal segura y una luz intermitente como señal aversiva. Para solucionar este problema, en este experimento y con un nuevo grupo de animales, se utilizaron dos señales ambientales con diferente entrada sensorial (estimulación visual y auditiva) para que fueran lo suficientemente diferentes para ser percibidas por los animales y mejorar su respectiva asociación con consecuencias apetitivas y aversivas.

Por tal motivo, se cambió la luz intermitente por un ruido blanco de 85 decibeles (db) para ser asociado con una consecuencia aversiva. De igual modo, durante este experimento, tratamos de mejorar la asociación de la luz continua con la disponibilidad de comida. Por lo cual, se diseñó una nueva subetapa conductual para mejorar el entrenamiento apetitivo-seguro. Así mismo, para el condicionamiento al miedo, se redujo la zona de peligro a las medidas de una caja estándar de condicionamiento al miedo; para mejorar el porcentaje de inmovilización durante el entrenamiento aversivo-peligroso.

4.2.2 Objetivos

- Diseñar y probar un nuevo entrenamiento conductual para mejorar la asociación de la luz continua con la disponibilidad de comida.

- Entrenar a los animales a asociar una señal auditiva (ruido blanco) con la presencia de una descarga eléctrica.
- Entrenar a los animales a discriminar entre la luz continua como señal segura y la señal auditiva como señal peligrosa, para poder probar la inhibición activa del miedo.

4.2.3 Procedimiento

I.- Entrenamiento apetitivo-seguro

Asociación luz-comida: Animales capacitados a presionar una palanca por comida (entrenamiento de palanqueo), fueron entrenados durante 6 días a asociar una luz continua con la disponibilidad de comida. Para realizar este entrenamiento las ratas fueron restringidas a una de las zonas seguras de la caja de entrenamiento (zonas seguras), mediante un acrílico oscuro. A continuación, de manera aleatoria, se presentaron dos tipos de ensayos: ensayos con presencia de la luz continua, en donde siempre que las ratas presionaron la palanca se les entregó comida, y ensayos sin presencia de la luz continua, en los cuales nunca se entregó comida aún si las ratas presionaban la palanca.

Los ensayos con luz continua se presentaron bajo un criterio mínimo de 5 palanqueos y máximo 20 palanqueos. Mientras que, los ensayos sin luz se presentaron durante un tiempo variable mínimo de 30 segundos y máximo de 180 segundos. Se registró de manera automática el número de palanqueos en ensayos con luz y ensayos sin luz y el tiempo específico para cada condición. Posteriormente, se calculó el palanqueo por minuto para ambos tipos de ensayos para evaluar la asociación de la luz continua con la disponibilidad de comida.

La figura 4.4A muestra el promedio y error estándar (SEM) del palanqueo por minuto en presencia (Luz) y ausencia (no luz) de la luz continua, a través del tiempo (D1-D6). Se observó que, durante el primer día de entrenamiento (D1) los animales tuvieron una mayor preferencia por palanquear en ausencia

de la luz continua (13 palanqueos/minuto) que en presencia de ésta (6 palanqueos/minuto). Esta preferencia por palanquear durante los ensayos sin luz pudo revertirse a partir del tercer día de entrenamiento (D3), en donde el palanqueo en ensayos con luz fue de 10 palanqueos por minuto; a diferencia de los ensayos sin luz, en donde disminuyó a 7 palanqueos por minuto.

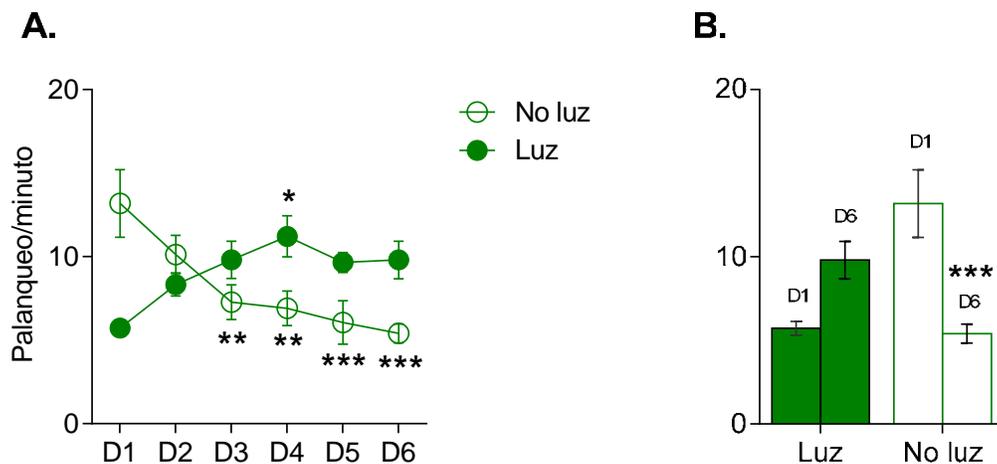


Figura 4.4. Entrenamiento apetitivo-seguro: asociación luz continua con disponibilidad de comida (n=6). **A.** La gráfica muestra el promedio y error estándar (SEM) del palanqueo por minuto en ensayos con luz y ensayos sin luz, a través del tiempo (D1-D7). Se encontraron diferencias significativas al comparar el palanqueo por minuto en presencia y ausencia de la luz continua durante el entrenamiento; $p=0.000$. Mediante una prueba Post-hoc se observó que durante los ensayos con luz los animales palanquearon significativamente diferente en el primer día (D1) comparado con el día cuatro (D4); $*p=0.0123$, mientras que, en los ensayos sin luz se obtuvieron diferencias significativas en el palanqueo del primer día (D1) comparado con el tercer (** $p=0.005$), cuarto (** $p=0.002$), quinto (** $p=0.000$) y sexto (** $p=0.000$). **B)** Resumen del entrenamiento de la asociación de la luz continua con disponibilidad de comida. La gráfica muestra las diferencias significativas encontradas en el palanqueo por minuto del primer día de entrenamiento (D1) comparado con el último día (D6) de entrenamiento, en presencia (Luz) y ausencia (No luz) de la luz continua; *** $p=0.000$.

La preferencia por palanquear en ensayos con luz se mantuvo a lo largo de los días de entrenamiento mientras que, el palanqueo en ensayos sin luz fue disminuyendo; como puede observarse en el último día de entrenamiento (D6, ensayos con luz= 10 palanqueos/minuto vs ensayos sin luz= 6 palanqueos/minuto). De modo que, encontramos que el palanqueo por minuto

difirió significativamente al ser comparado con la presencia y ausencia de la luz continua a través del entrenamiento; ANOVA (2 vías) de medidas repetidas, $F_{(5,50)} = 11.4$, $p = 0.000$.

Para evaluar las diferencias específicas por cada día de entrenamiento en ausencia y presencia de la luz continua, realizamos una prueba Post Hoc (Tukey HSD). Encontramos diferencias significativas sólo en el primer día de entrenamiento (D1, 6 palanqueo/min) comparado con el cuarto día de entrenamiento (D4, 11 palanqueo/min) en los ensayos con presencia de la luz; $p = 0.012$, el cual, fue el día en que más veces por minuto palanquearon los animales por comida.

En los ensayos sin luz se encontraron diferencias significativas en el primer día de entrenamiento (D1, 13 palanqueo/min) comparado con el tercer (D3, palanqueo/min, $p = 0.005$), cuarto (D4, 6 palanqueo/min, $p = 0.002$), quinto (D5, 6 palanqueo/min, $p = 0.000$) y sexto (D6, 6 palanqueo/min, $p = 0.000$) día. De igual forma, encontramos diferencias estadísticamente significativas en la preferencia inicial (D1) de los animales por palanquear en condiciones oscuras, que en presencia de la luz continua (Ensayos con luz 6 palanqueos/minuto vs 14 palanqueos/minuto); $p = 0.000$.

Durante este entrenamiento observamos que los animales de manera natural prefieren presionar la palanca por comida en ausencia de la luz; sin embargo, el reforzar la conducta de palanqueo sólo en condiciones donde la luz continua estuvo presente, pero no así para los ensayos sin presencia de ésta, permitió que los animales aprendieran a asociar la luz continua con la disponibilidad de comida. Lo cual, se ve reflejado en el incremento de palanqueos por minuto en ensayos con luz continua y el decremento de éstos en ensayos sin presencia de la luz; al comparar el primer día (D1) de entrenamiento con el último día (D6), como lo muestra la Figura 4.4B. Confirmando así, que la luz continua funciona bien como una señal apetitiva y que puede ser utilizada para guiar a los animales hacia la disponibilidad de comida.

Cruces seguros: Una vez que los animales aprendieron a presionar la palanca por comida sólo en presencia de la luz continua (asociación de luz con disponibilidad de comida), se les permitió cruzar por comida guiándose por esta señal apetitiva.

El procedimiento para este entrenamiento se realizó de la misma manera que en el experimento 1, a excepción de que el número de días de entrenamiento se logró reducir a sólo 3 días. Para todos los ensayos de cruces se registraron y analizaron las latencias de cruces y el tiempo de desplazamiento en cada día de entrenamiento.

La figura 4.5A muestra el promedio de las latencias de cruces (medidas en seg) y los desplazamientos a través del tiempo (D1-D3). Se encontró que, durante el primer día de entrenamiento los animales tuvieron latencias de cruces cercanas a los 18 seg, mientras que, el tiempo de desplazamiento fue de sólo 12 segundos.

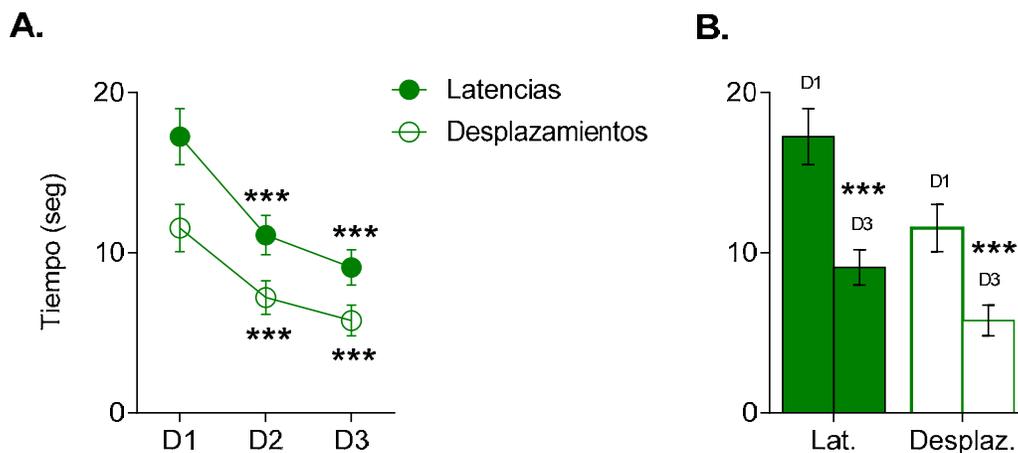


Figura 4.5. Entrenamiento apetitivo-seguro: cruces seguros (n=6). **A)** Se representa el promedio y error estándar (SEM) del tiempo transcurrido en las latencias de cruces y desplazamientos en los ensayos de cruces indicados por la luz continua a lo largo del tiempo (D1-D3). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas de las latencias de cruces y los desplazamientos a través del tiempo; ***p= 0.000. Especialmente en la latencias y desplazamientos del primer día (D1) versus el segundo (D2) y tercer día (D3), ***p=0.000. **B)** Resumen del entrenamiento de cruces seguros. Se muestran las diferencias significativas al comparar el primer día de entrenamiento (D1) con el último día de entrenamiento (D3), de las latencias de cruces y el tiempo de desplazamiento; *** p= 0.000.

Las latencias de cruces y desplazamientos fueron disminuyendo eficazmente en tan sólo 2 días más de entrenamiento, como lo muestra el último día de entrenamiento (D3) cuyas latencias de cruces fueron de 9 segundos y los desplazamientos de 6 segundos. La diferencia del tiempo en que tardaron los animales en presionar la palanca por comida, después de haberse desplazado, durante el primer día de entrenamiento fue de 5 segundos. Estas, fueron disminuyendo conforme a los días de entrenamiento; como lo muestra el tercer día en donde sólo se tardaron 3 segundos en presionar la palanca después de haberse desplazado.

Al igual que en el experimento 1, no encontramos diferencias significativas entre el desplazamiento y las latencias de cruces; ANOVA (2 vías) de medidas repetidas, F de interacción $(2,20)= 1.27$, $p=0.301$. Sin embargo, sí encontramos diferencias estadísticamente significativas en las latencias de cruces y los desplazamientos con respecto a los días de entrenamiento (D1-D3); $F_{(2,20)}= 42.69$, $p= 0.000$. Una prueba Post Hoc (Tukey HSD) encontró diferencias significativas de las latencias de cruces del primer día de entrenamiento (D1, 18 segundos) comparado con el segundo (D2, 11 segundos) y tercer día de entrenamiento (D3, 9 segundos), $p=0.000$.

Así mismo, se encontraron estas mismas diferencias significativas en el tiempo de desplazamientos (D1, 11.5 segundos Vs D2, 7 segundos y D3, 5 segundos), $p=0.000$. El análisis estadístico sugiere que después de que los animales fueron entrenados a asociar la luz continua con la disponibilidad de comida, son necesarias sólo 3 días más de entrenamiento para que aprendan a cruzar por comida ante la presencia de esta señal apetitiva (Figura 4.5B), a diferencia del experimento 1 en donde fueron necesarias al menos 7 días de entrenamiento para lograr latencias de cruces cercanas a los 10 segundos.

II. Entrenamiento aversivo- peligroso

Para mejorar la asociación de la señal aversiva sustituimos la luz intermitente por una señal auditiva, en este experimento utilizamos un ruido blanco de 85 decibeles (db) como EC y la descarga eléctrica como EI. Aumentamos la intensidad de la descarga eléctrica a 1 mA para obtener un

condicionamiento más robusto y mayor porcentaje de inmovilización. Así mismo, para evitar que los animales tuvieran conductas de escape redujimos el espacio de la zona de peligro, en donde se realizó la adquisición y prueba del condicionamiento al miedo (parrilla de 62 cm x 30 cm), a las medidas de una caja estándar de condicionamiento al miedo (25.40 cm x 30.4 cm). Así, procuramos que los animales, al tener un espacio más reducido de exploración, respondieran con mayor tiempo de inmovilización y menor tiempo con conductas de escape ante la presencia del EC.

Finalmente, antes de iniciar la adquisición y prueba del condicionamiento al miedo les dimos de comer a los animales (12 gramos) para evitar que estuvieran hambrientas y esto provocara una mayor movilidad de los animales durante el condicionamiento.

Con todas estas modificaciones, la adquisición del condicionamiento al miedo se realizó al presentar durante 30 segundos el EC, seguido de la presencia del EI durante 1 segundo; a diferencia del experimento 1 en donde se presentó sólo medio segundo (0.5 seg). La presentación de ruido blanco y descarga eléctrica (EC-EI) se repitió sólo 3 veces, debido a la alta intensidad y duración de la descarga eléctrica.

Veinticuatro horas después de la adquisición del condicionamiento al miedo, se realizó una prueba para evaluar el aprendizaje de asociación de EC-EI. La prueba se realizó repitiendo 2 veces la presentación del EC durante 30 segundos; con un intervalo de separación de 60 a 180 min. Al igual que en el experimento 1, durante la adquisición del Condicionamiento al miedo, se midió el tiempo en que los animales permanecieron inmóviles durante la ausencia del EC y después (60 segundos) de presentar la relación EC-EI.

La figura 4.6A muestra el promedio y error estándar (SEM) del porcentaje de inmovilización antes (PRE) y después de presentar la relación EC-EI (POST EC-EI) a través del tiempo (3 presentaciones de EC-EI). Se observó que en ausencia del EC los animales no presentaron altos porcentajes de inmovilización (2%). Mientras que, después de presentar las tres repeticiones

de EC-EI los animales mostraron mayor porcentaje de inmovilización (EC-EI 1= 5%; EC-EI 2=10%; EC-EI 3= 16%).

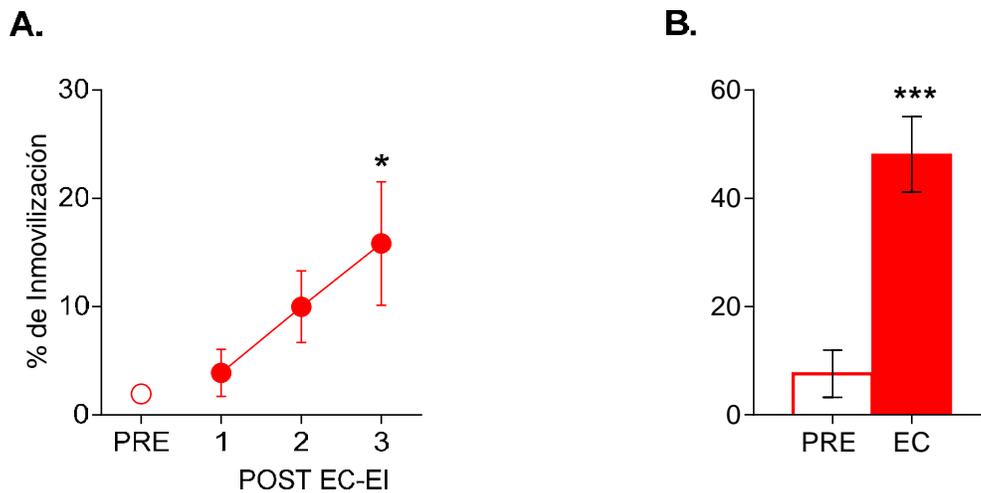


Figura 4.6. Entrenamiento aversivo-peligroso (n=6). **A)** Adquisición del condicionamiento al miedo. Se muestra el promedio y error estándar (SEM) del porcentaje de inmovilización durante la habituación (PRE) y después de haber presentado la relación EC-EI; a través de las 3 presentaciones de la asociación EC-EI (1-3). Se encontraron diferencias significativas del porcentaje de inmovilización durante la habituación (PRE) y las 3 presentaciones del EC-EI; $p=0.0141$. Una prueba Post Hoc encontró sólo diferencias significativas al comparar el porcentaje de inmovilización obtenido durante la habituación (PRE) con respecto a la tercera presentación de EC-EI; $*p=0.0152$. **B)** Prueba de condicionamiento al miedo. Se muestra el promedio y error estándar (SEM) del porcentaje de inmovilización obtenido durante el PRE, comparado con el porcentaje de inmovilización obtenido durante la presentación del EC. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el porcentaje de inmovilización ante la ausencia (PRE) y presencia (EC) del ruido blanco; $*** p=0.000$.

Las diferencias encontradas en el porcentaje de inmovilización a través de las 3 presentaciones de EC-EI resultaron ser estadísticamente significativas, según lo encontrado por un ANOVA (1 vía) de medidas repetidas; $F_{(3,15)}= 4.9$, $p= 0.0141$. Una prueba Post Hoc (Tukey HSD) arrojó diferencias significativas al comparar el tiempo de inmovilización durante la habituación (2%) versus la tercera presentación de EC-EI (16%); $p=0.0152$. Este análisis sugiere que, conforme presentamos las repeticiones de la relación EC-EI los animales van adquiriendo mayor conducta de inmovilización ante el ruido blanco. Lo cual se

vio reflejado en los resultados encontrados durante la prueba del condicionamiento al miedo, como lo muestra la figura 4.6B. En la gráfica se muestra el promedio y error estándar del porcentaje de inmovilización antes de presentar el EC (PRE) y durante la presentación del EC (promedio de las 2 presentaciones del EC).

Se encontró que durante la presencia del ruido blanco los animales tuvieron un porcentaje de inmovilización del 50%, la cual se comparó con el porcentaje inmovilización antes de presentar el EC, que fue menor al 10%. Las diferencias encontradas en la proporción del tiempo en que los animales permanecieron inmóviles ante la ausencia y presencia del ruido blanco, fueron estadísticamente significativas; según lo arrojado por una *t* de Student para muestras pareadas, $t_{(5)}=7.89$, $p=0.000$. Un mayor porcentaje de inmovilización durante la presentación del ruido blanco sugiere que los animales aprendieron eficazmente a asociar el ruido blanco como una señal aversiva que predice la ocurrencia de una descarga eléctrica.

III. Entrenamiento de discriminación

Una vez que los animales aprendieron a asociar la luz continua con la disponibilidad de comida (entrenamiento seguro) y el ruido blanco con la presencia de la descarga eléctrica (condicionamiento al miedo), comenzó el entrenamiento de discriminación de ensayos.

El entrenamiento de discriminación de ensayos se realizó de la misma manera que en el experimento 1, a excepción de que los ensayos peligrosos fueron indicados por el ruido blanco para señalar la presencia de la descarga eléctrica; junto con la luz continua, para señalar en qué zona segura estaría disponible la comida.

La descarga eléctrica presente en los ensayos peligrosos fue de una intensidad de 0.6 mA; menor a la utilizada en el condicionamiento al miedo para evitar que los animales dejaran de cruzar.

Las latencias de cruces y el tiempo de desplazamiento se registraron automáticamente en ambos ensayos y el porcentaje de riesgo se estableció entre el 10 y 30 % conforme el día de entrenamiento. Se siguió el mismo criterio de discriminación y el mismo análisis de datos establecido en el experimento 1.

La figura 4.7A muestra el promedio y error estándar (SEM) sólo de las latencias de cruces en ensayos seguros y ensayos peligrosos, a través del tiempo (D1-D7) y su respectivo porcentaje de riesgo. Para este experimento, también, graficamos sólo los 7 primeros ensayos seguros y los 3 primeros ensayos peligrosos. Como puede observarse, durante el primer día de entrenamiento (D1) hubo una ligera diferencia en las latencias de cruces de los ensayos seguros (33.5 seg) comparado con los ensayos peligrosos (51.5 seg). Sin embargo, durante el tercer día de entrenamiento (D3) las latencias de cruces (seg) para ambos ensayos fueron similares (Seguros 78 seg vs Peligrosos 75 seg). Por lo cual, decidimos aumentar el porcentaje de riesgo del 10% al 30% en los días posteriores (D4-D7). Observamos así, nuevamente una ligera diferencia en las latencias de cruces para ambos ensayos; como puede observarse en el quinto día de entrenamiento (D5), en donde las latencias de cruces (seg) en ensayos peligrosos fueron relativamente mayores que en los ensayos seguros (96.5 seg vs 65.5 seg respectivamente).

Conforme avanzaron los días de entrenamiento, los animales comenzaron a reducir las latencias de cruces para ambos ensayos. Como puede observarse en el último día de entrenamiento (D7), cuyas latencias de cruces en ensayos seguros fueron de 33 segundos comparadas con las latencias de cruces obtenidas en ensayos peligrosos en donde fueron de 61 segundos.

A pesar de que las latencias de cruces en ensayos peligrosos fueron mayores que en los ensayos seguros estas diferencias no fueron estadísticamente significativas con respecto al tiempo de entrenamiento, ANOVA (2 vías) de medidas repetidas $F_{(6,60)} = 1.69, p=0.137$.

Se compararon las latencias de cruces en ensayos seguros y peligrosos del último día de entrenamiento (D7), no se encontraron diferencias

estadísticamente significativas; t de Student, $t_{(6)} = 2.07$, $p = 0.095$, por lo que, el criterio de discriminación nuevamente no se cumplió.

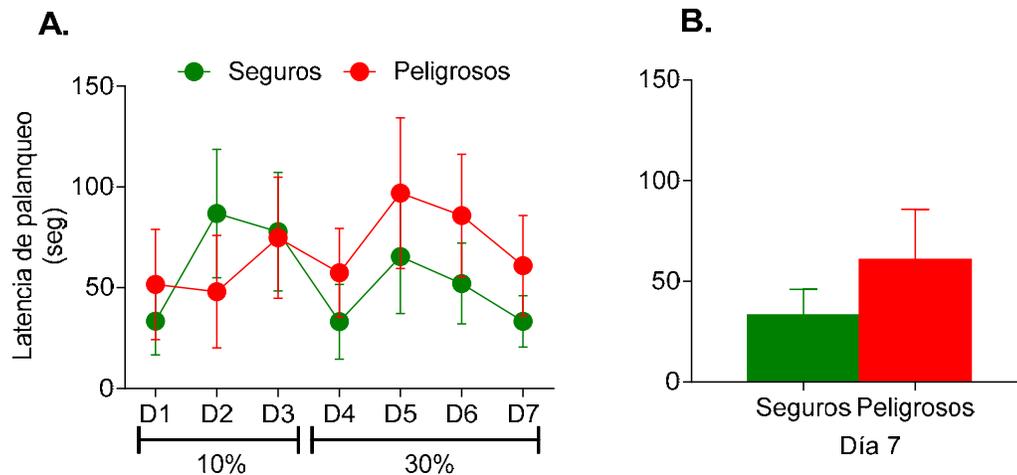


Figura 4.7. Entrenamiento de discriminación (n=6). **A)** La gráfica representa el promedio y error estándar (SEM) de latencias de cruces (seg) en ensayos seguros y ensayos peligrosos a través del tiempo (D1-D7). Se muestra para cada día de entrenamiento, el porcentaje de riesgo utilizado para entrenar a los animales (D1-D4 10% de riesgo; D5-D7 30%). No se encontraron diferencias significativas al comparar el tiempo que tardaron los animales en cruzar y presionar la palanca por comida en ensayos seguros versus los ensayos peligrosos; $p=0.137$. **B)** Comparación de las latencias de cruces (seg) en ensayos seguros con respecto a los ensayos peligrosos en el último día de entrenamiento (D7). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las latencias de cruces de ensayos seguros versus los ensayos peligrosos, $p=0.095$. Por lo que, no se cumplió el criterio de discriminación para realizar la prueba de inhibición activa del miedo.

Los resultados encontrados en este entrenamiento sugieren que, a pesar de los cambios realizados en el entrenamiento de la señal apetitiva y aversiva, los animales no lograron discriminar significativamente entre la luz continua para los ensayos seguros, y el ruido blanco para los ensayos peligrosos. Sin embargo, en esta ocasión, sí observamos una ligera tendencia de latencias de cruces mayores en los ensayos peligrosos que en los ensayos seguros; sobretodo, al entrenar a los animales con un porcentaje de riesgo del 30%. A pesar de esto, estas diferencias no lograron cumplir el criterio de

discriminación; siendo imposible realizar y evaluar la prueba de inhibición activa del miedo en busca de una recompensa.

4. 2.4 Discusión experimento 2

Durante este experimento diseñamos una subetapa conductual para mejorar el entrenamiento de la luz continua como señal apetitiva. Encontramos que presentar de manera alternada ensayos con presencia y ausencia de la luz continua, reforzando únicamente los ensayos con luz, permite que los animales mejoren la asociación de la luz continua con la disponibilidad de comida. Lo cual, se ve reflejado en una mayor preferencia por palanquear por comida en condiciones en donde está la luz presente y en una disminución del palanqueo en condiciones en donde la luz está ausente (Figura 4.4).

Así mismo observamos que los animales, después de ser entrenados bajo esta subetapa conductual, mejoraron notoriamente su desempeño para cruzar por comida guiándose por esta señal apetitiva. Esto permitió que lográramos reducir el tiempo de entrenamiento de 7 días que se utilizaron en el experimento 1 a sólo 3 días, para conseguir latencias de cruces cercanas a los 9 segundos. Con lo cual podemos asegurar que, mediante estas dos etapas conductuales, los animales aprenden eficazmente a percibir la luz continua como una señal apetitiva.

En cuanto al entrenamiento de la señal aversiva, decidimos cambiar la luz intermitente por el ruido blanco de 85 (db) como EC; para mejorar el entrenamiento aversivo. De igual modo, durante el condicionamiento, aumentamos la intensidad de la descarga eléctrica y redujimos la zona de entrenamiento para mejorar el porcentaje de inmovilización de los animales ante el EC.

Encontramos que, todas estas modificaciones mejoraron ligeramente el tiempo en que los animales permanecieron inmóviles ante la presencia del ruido blanco (50%). Lo cual nos sugiere que este estímulo resultó ser eficaz para ser asociado con un evento aversivo. Sin embargo, el porcentaje de

inmovilización encontrado durante el EC, al igual que en el experimento anterior, resultó ser muy débil para la intensidad de la descarga eléctrica utilizada (Figura 4.5A y 4.5B). Por lo cual, fue necesario mejorar el entrenamiento del condicionamiento al miedo.

Para el entrenamiento de discriminación de ensayos, el utilizar el ruido blanco como señal aversiva mejoró notablemente la señalización de los ensayos peligrosos a diferencia de lo encontrado en el experimento 1. Observamos que, a pesar de que no encontramos diferencias significativas en las latencias de cruces en los ensayos peligrosos comparados con los ensayos seguros, hubo una ligera tendencia de latencias de cruces mayores en el peligro que en lo seguro; sobre todo, al aumentar el porcentaje de riesgo de un 10 % al 30%.

Vimos que después de 3 días de entrenamiento de usar este mismo porcentaje de riesgo, los animales comenzaron a bajar sus latencias de cruces para ambos ensayos; por lo que, es posible que en este entrenamiento sea necesario seguir aumentando el porcentaje de riesgo o la intensidad de la descarga eléctrica para evitar que los animales se habitúen a la aversión de los ensayos peligrosos.

Al igual que en el primer experimento, no tuvimos éxito para cumplir el criterio de discriminación y poder realizar la prueba de inhibición activa del miedo (Figura 4.6B). Conductualmente observamos que los animales al escuchar el ruido blanco cruzaron más rápido los primeros ensayos peligrosos que los seguros, sobre todo en los primeros días del entrenamiento. Lo cual puede estar relacionado con la forma en que entrenamos a los animales para que adquieran la asociación de la señal aversiva, puesto que, la descarga eléctrica siempre se presentó hasta el final del tiempo de presentación del ruido blanco, y sólo durante un tiempo máximo de 1 segundo.

Un problema más que detectamos durante este entrenamiento, fue que la mayoría de las ratas al escuchar el ruido blanco se acercaron a las parrillas y con las vibrisas censaron si la descarga eléctrica estaba presente o no. Esta conducta pudo provocar que las diferencias encontradas en las latencias de

cruces para ambos ensayos estuvieran relacionadas con que los animales censaran la parrilla, y no necesariamente por que hubieran aprendido la relación del ruido blanco con los ensayos peligrosos. Por tal motivo, fue necesario probar un nuevo experimento para poder mejorar el entrenamiento del ruido blanco y su consecuencia aversiva, así como, el entrenamiento de discriminación de ensayos; para lograr evaluar la inhibición activa del miedo.

4. 3 EXPERIMENTO 3

4.3.1Resumen

Durante el experimento anterior diseñamos una subetapa conductual para el entrenamiento apetitivo-seguro, con el cual, mejoramos significativamente la asociación de la luz continua como señal apetitiva. En el entrenamiento aversivo-peligroso sustituimos la luz intermitente por un estímulo auditivo para ser asociado con la presencia de la descarga eléctrica. Así mismo, redujimos el espacio utilizado para condicionar a los animales, a las medidas (altura y longitud) de una caja estándar de condicionamiento al miedo. Sin embargo, continuamos teniendo problemas para que los animales tuvieran porcentajes altos de inmovilización durante la presencia del ruido blanco. Para mejorar este problema, en el presente experimento, se añadieron más días de entrenamiento para condicionar a los animales.

En cuanto al entrenamiento de discriminación, no logramos que los animales difirieran significativamente entre ensayos seguros y peligrosos; por lo que, fue imposible cumplir el criterio de discriminación establecido y evaluar la inhibición activa del miedo. Detectamos, también, que durante las primeras sesiones de entrenamiento los animales al percibir el ruido blanco mostraron conductas de escape cruzando rápidamente hacia las zonas seguras de la caja de entrenamiento. Se pensó que esta conducta pudiera deberse a la forma en que entrenamos a los animales para que adquirieran la asociación de la señal aversiva/peligrosa. Por lo que, realizamos cambios importantes en el condicionamiento al miedo y agregamos una nueva subetapa conductual para

que los animales aprendieran que la descarga eléctrica estaría presente el mismo tiempo de duración del ruido blanco en los ensayos peligrosos.

4.3.2 *Objetivos*

- Mejorar la asociación del ruido blanco con su consecuencia aversiva y peligrosa, durante el condicionamiento al miedo.
- Evitar que los animales traten de escapar de la descarga eléctrica al percibir el ruido blanco en los ensayos peligrosos.
- Lograr que los animales discriminen ensayos seguros y peligrosos, para poder evaluar la inhibición activa del miedo.

4.3.3 *Procedimiento*

I. Entrenamiento apetitivo-seguro

Asociación de señal apetitiva/segura: El entrenamiento para que los animales aprendieran a asociar la luz continua con la disponibilidad de comida, se realizó de la misma manera que en el experimento 2. Se analizó el número de veces por minuto que los animales palanquearon por comida, en ensayos con presencia de la luz continua (Luz) y en ausencia de ésta (No luz).

La figura 4.8A muestra el promedio y error estándar (SEM) del palanqueo por minuto en ambas condiciones (luz/no luz) a través del tiempo (D1-D6). Se encontró que, al inicio del entrenamiento (D1) los animales palanquearon de manera similar en ausencia y presencia de la luz continua (8 palanqueos/minuto en ambas condiciones); a diferencia del experimento 2, en donde se observó una mayor preferencia de los animales por palanquear en condiciones oscuras. Así mismo, se observó que a partir del tercer día de entrenamiento (D3) los animales aumentaron el número de palanqueos por minuto en ensayos con presencia de la luz continua (10 palanqueos/minuto) y disminuyeron el palanqueo en ensayos sin luz (6 palanqueo/minuto).

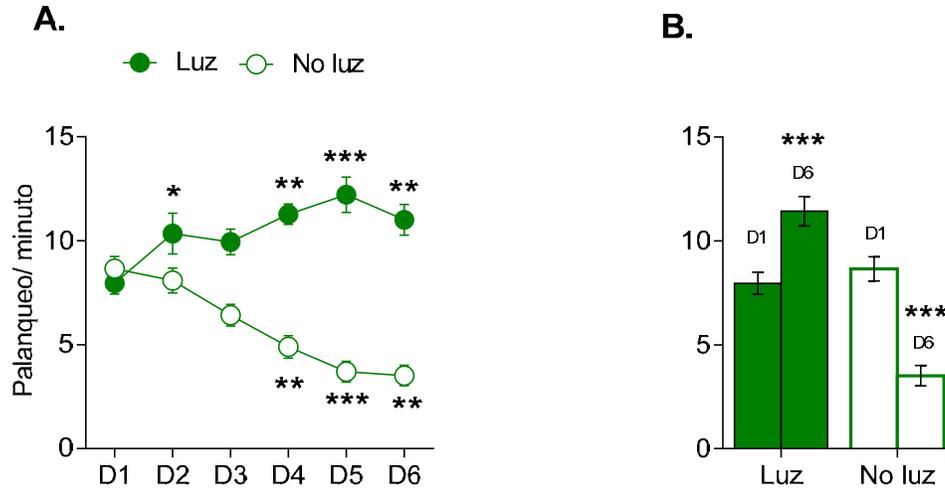


Figura 4.8 Entrenamiento apetitivo-seguro: asociación de luz continua con disponibilidad de comida (n=13). A) La gráfica muestra el promedio y error estándar (SEM) del palanqueo por minuto en ensayos con luz y sin luz a través del tiempo (D1-D6). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la proporción de palanqueo por minuto en ausencia (No luz) y presencia (Luz) de la luz continua a lo largo del entrenamiento; $p=0.000$. Se encontró mediante una prueba Post Hoc que durante los ensayos con luz los animales palanquearon significativamente diferente en el primer día de entrenamiento (D1) comparado con el segundo (D2, $*p=0.04$) cuarto (D4, $**p=0.006$), quinto (D5, $***p=0.000$) y sexto (D6, $**p=0.001$) día de entrenamiento. Mientras que, en los ensayos sin presencia de la luz (No luz) los animales presionaron la palanca significativamente diferente durante el primer día de entrenamiento (D1) comparado con el cuarto (D4, $**p=0.0014$), quinto (D5, $p=0.000$) y sexto día (D6, $p=0.000$) de entrenamiento. **B)** Resumen del entrenamiento de asociación luz continua con disponibilidad de comida. Se muestra las diferencias significativas al comparar el promedio del palanqueo por minuto del primer (D1) y último día (D6) de entrenamiento, en presencia y ausencia de la señal apetitiva; $*** p=0.000$.

Esta preferencia por presionar la palanca en presencia de la luz continua, se mantuvo e incrementó conforme avanzaron los días de entrenamiento; como puede observarse en el último día de entrenamiento (D6) en donde tuvieron 11 palanqueos por minuto en ensayos con luz, mientras que, en los ensayos sin luz el palanqueo por comida disminuyó a 4 palanqueos por minuto.

Las diferencias encontradas del palanqueo por minuto en presencia y ausencia de la luz continua a través de los días de entrenamiento (D1-D6), resultaron ser estadísticamente significativas; ANOVA (2 vías) de medidas

repetidas. $F_{(5,120)} = 24.8$, $p = 0.000$. Una prueba Post Hoc (Tukey HSD) arrojó diferencias significativas del primer día de entrenamiento (D1, 8 palanqueos/minuto) comparado con el cuarto (D4=11 palanqueo/minuto, $p=0.0014$), quinto (D5=12 palanqueo/minuto, $p=0.000$) y sexto día de entrenamiento (D6=11 palanqueo/minuto, $p=0.000$); para los ensayos con ausencia de la luz continua (No luz).

En los ensayos con presencia de la luz continua encontramos diferencias significativas del primer día de entrenamiento (D1, 8 palanqueos/minuto) comparado con el segundo (D2= 8 palanqueo/minuto, $p=0.042$), cuarto (D4= 4.8 palanqueo/minuto, $p=0.006$), quinto (D5= 4 palanqueo/minuto, $p=0.000$) y sexto (D6= 4 palanqueo/minuto, $p= 0.001$) día de entrenamiento. Así mismo, encontramos que la preferencia de los animales por presionar la palanca en condiciones con la luz continua presente en todos los días de entrenamiento (D1-D6) fue significativamente diferente a la menor proporción de presionar la palanca en ensayos sin luz, específicamente en el cuarto (D4), quinto (D5) y sexto (D6) día de entrenamiento; $p=0.000$.

Los resultados encontrados sugieren que, al igual que en el experimento anterior, después de 6 días de entrenamiento los animales aprenden a asociar la luz como una señal apetitiva. Este aprendizaje se ve reflejado en el incremento de palanqueos por minuto en ensayos con luz y el decremento de éstos en ensayos sin presencia de la señal apetitiva (Figura 4.8B), confirmando así, que la luz continua funciona bien como una señal apetitiva y que puede ser utilizada para guiar a los animales hacia la disponibilidad de comida.

Cruces seguros: Una vez que confirmamos que los animales habían asociado la luz continua con la disponibilidad de comida, entrenamos a los animales durante 5 días a cruzar por comida guiándose por esta misma señal apetitiva.

El procedimiento para este entrenamiento se realizó de la misma manera que en el experimento anterior, a excepción de que aumentamos dos días de entrenamiento. Lo cual, se realizó para evaluar el mínimo tiempo posible en que los animales podían cruzar y presionar la palanca por comida (latencias de

cruces) y el mínimo tiempo posible en que los animales podía desplazarse, en este entrenamiento.

La figura 4.9A muestra el promedio de las latencias de cruces y el tiempo de desplazamientos obtenidos a lo largo del tiempo (D1-D5). Como puede apreciarse, durante el primer día de entrenamiento los animales tuvieron latencias de cruces de 18 segundos y desplazamientos de 14 segundos (igual que en el experimento 2). Las latencias disminuyeron a la mitad del tiempo en tan sólo 2 días más de entrenamiento, como se observa en el tercer día de entrenamiento (D3) en donde los tiempos de cruces fueron de 9 segundos y los desplazamientos de 6 segundos.

El tiempo que tardaron los animales en cruzar y palanquear por comida, así como en desplazarse durante el tercer día de entrenamiento se mantuvo hasta el final del entrenamiento (D5, latencias de cruces= 8.9 segundos; desplazamientos = 5.8 segundos). La diferencia del tiempo en que tardaron los animales en presionar la palanca por comida, después de haberse desplazado, fue alrededor de 3 segundos; lo cual corrobora con los experimentos anteriores.

Las diferencias de tiempo en las latencias de cruces y los desplazamientos, no resultaron ser estadísticamente significativas según lo encontrado por un ANOVA (2 vías) de medidas repetidas; F interacción (4,96): 0.44, $p= 0.774$ Sin embargo, sí encontramos diferencias significativas en las latencias de cruces y el desplazamiento con respecto a los días de entrenamiento; F (4,96): 123.77, $p= 0.000$. Realizamos una prueba Post-Hoc (Tukey HSD) para evaluar las diferencias significativas específicas de cada medición y el día de entrenamiento. Encontramos que, tanto en las latencias de cruces como en los desplazamientos, el primer día de entrenamiento (D1, latencias de cruces= 18 seg; desplazamientos, 14 seg) difirió significativamente del resto de los días de entrenamiento (D2, latencias de cruces= 11 seg, desplazamientos=8 seg; D3-D5, latencias de cruces= 9 seg, desplazamientos=6 seg); $p= 0.000$.

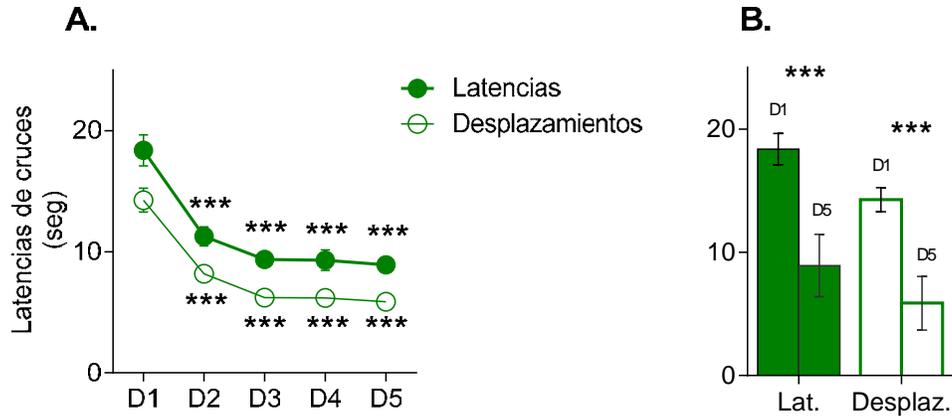


Figura 4.9. Entrenamiento apetitivo-seguro: cruces seguros (n=4). **A)** La gráfica muestra el promedio y error estándar (SEM) de las latencias de cruces y los desplazamientos (seg) en los ensayos de cruces indicados por la luz continua a lo largo del tiempo (D1-D3). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas de las latencias de cruces y los desplazamientos a través del tiempo; $p=0.000$, pero no así en su interacción; $p=0.774$. Una prueba Post Hoc encontró que tanto en latencias de cruces como en el desplazamiento, el primer día de entrenamiento (D1) difirió significativamente del resto de los días de entrenamiento (D2-D5); $***p=0.000$. **B)** Resumen del entrenamiento de cruces seguros. La gráfica muestra el primer día (D1) de entrenamiento, comparado con el último día (D3) de entrenamiento de las latencias de cruces y el tiempo de desplazamiento. El tiempo que tardaron los animales en desplazarse y presionar la palanca por comida del primer día difirió significativamente del último día de entrenamiento (D5); $*** p=0.000$.

Las diferencias encontradas en las latencias de cruces y desplazamientos del primer día de entrenamiento comparado con el último día sugieren que, los animales aprendieron eficazmente a buscar comida guiadas por la señal apetitiva (Figura 4.9B). Así mismo, observamos que sólo 3 días de entrenamiento son necesarios para que los animales aprendieran a cruzar por comida en presencia de la luz continua; después del tercer día de entrenamiento las latencias de cruces y los desplazamientos no logran bajar más de lo obtenido en tres días de entrenamiento.

II. Entrenamiento aversivo-peligroso

Asociación de la señal aversiva-peligrosa: Para evitar que los animales aprendieran a predecir la presencia de la descarga eléctrica de manera temporal (siempre al final de la presentación del ruido blanco), se programó el

equipo para que ésta fuera entregada de manera aleatoria en cualquier momento de la presentación del EC. Es decir, al inicio, en medio o al final del tiempo de presentación del ruido blanco.

Así mismo, para mejorar la asociación del ruido blanco con la descarga eléctrica, los animales fueron condicionados durante más días de entrenamiento y expuestos durante más tiempo al contexto en donde se realizó el condicionamiento. Al igual que en el experimento anterior, se utilizó el ruido blanco de 85 db como EC y la descarga eléctrica como EI. De modo que, se realizó lo siguiente:

Después de que los animales aprendieron a cruzar por comida, guiándose por la luz continua, durante un día se expuso a los animales al contexto en donde se realizó el condicionamiento al miedo (zona reducida de las parrillas); permitiéndoles así explorar durante más tiempo (20 minutos) el contexto sin la presentación de ningún estímulo. Al día siguiente, los animales fueron condicionados al miedo presentando el ruido blanco (EC) durante 30 segundos, acompañado de una descarga eléctrica (EI) de 0.5 mA; presentada de manera aleatoria durante 1 segundo. La intensidad del EI se redujo, en este experimento, debido a que agregamos 3 días más de entrenamiento. Cada día de entrenamiento contó con la presentación de 5 repeticiones de EC-EI, separadas por un intervalo de 60 a 180 segundos.

Al igual que en experimentos anteriores, para cada día de condicionamiento medimos el tiempo de inmovilización de los animales durante la habituación y 60 segundos después de haber presentado la relación EC-EI.

La figura 4.10A muestra el promedio y error estándar (SEM) del porcentaje de inmovilización durante la habituación del primer día de condicionamiento (PRED1) y después de haber presentado la relación EC-EI (POST EC-EI) a través del tiempo (D1-D4). Para cada día de entrenamiento, se graficó el promedio de las 5 presentaciones de EC-EI.

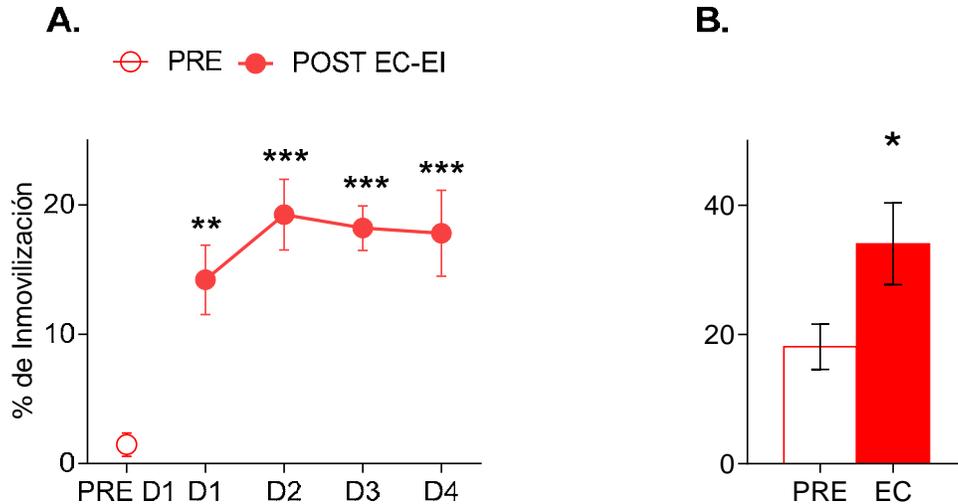


Figura 4.10. Entrenamiento aversivo-peligroso: asociación ruido blanco con presencia de descarga eléctrica (n=13). **A)** Adquisición del condicionamiento al miedo. La gráfica muestra el promedio y error estándar (SEM) del porcentaje de inmovilización durante la habituación (PRE) y después de haber presentado la relación EC-EI; a través del tiempo (D1-D4). Para cada día de entrenamiento, se graficó el promedio del porcentaje de inmovilización de las 5 presentaciones de la relación EC-EI. Se encontraron diferencias significativas del porcentaje de inmovilización a través del tiempo; $p=0.000$. Una prueba Post Hoc (Tukey HSD) encontró diferencias significativas al comparar el porcentaje de inmovilización que mostraron los animales durante el PRE (2%) versus el primer (D1=14%, $**p=0.001$), segundo (D2=19%, $***p=0.000$), tercer (D3=18%, $***p=0.000$) y cuarto (D4=18%, $***p=0.000$) día de condicionamiento. **B)** Prueba del Condicionamiento al miedo. Se muestra el promedio y error estándar (SEM) del porcentaje de inmovilización ante la ausencia del EC (PRE) y después de la presencia del EC. El porcentaje del tiempo de inmovilización que los animales permanecieron inmóviles antes de presentar el EC difirió significativamente del porcentaje de inmovilización obtenido después de presentar el EC; $* p= 0.025$.

Se encontró que, durante la habituación del primer día del condicionamiento, los animales mostraron poco porcentaje de inmovilización como se esperaba (<5%). Mientras que, después de presentar la relación EC-EI este porcentaje de inmovilización aumentó conforme avanzaron los días de entrenamiento; el cual fluctuó alrededor del 18%. De este modo, el porcentaje de tiempo en que los animales permanecieron inmóviles durante la ausencia de la descarga eléctrica (PRE D1) difirió significativamente del porcentaje de tiempo en que los animales permanecieron inmóviles después de presentar las

5 repeticiones de EC-EI; ANOVA (1 vía) de medidas repetidas, $F_{(4, 48)} = 11.68$, $p=0.000$.

Para evaluar las diferencias específicas del porcentaje de inmovilización a través de los días de entrenamiento, realizamos una prueba Post Hoc de múltiples comparaciones (Tukey HSD), la cual mostró diferencias significativas al comparar el porcentaje de inmovilización que mostraron los animales durante el PRE (2%) versus el primer (D1=14%, $p=0.001$), segundo (D2=19%, $p=0.000$), tercer (D3=18%, $p=0.000$) y cuarto (D4=18%, $p=0.000$) día de condicionamiento.

Después de condicionar a los animales durante 4 días seguidos, veinticuatro horas después, se realizó la prueba del condicionamiento al miedo. Esta se realizó presentando dos veces el EC durante 30 segundos. Al término de la prueba del condicionamiento, se midió el tiempo de inmovilización de los animales ante la ausencia del EC (habitación) y 60 segundos después de haber presentado el EC. La Figura 4.10B muestra el porcentaje de inmovilización durante la habitación (PRE) y después de presentar el EC. Observamos que, los animales tuvieron un mayor porcentaje de inmovilización después de haber presentado el EC (34% de inmovilización) comparado con el tiempo de habitación (18%).

Las diferencias encontradas en el porcentaje de inmovilización antes y después de presentar el EC, resultaron ser estadísticamente significativas; t de Student de para muestras pareadas, $t_{(12)} = 2.55$, $p=0.025$. Los resultados obtenidos mediante este análisis demuestran que después de varios días de condicionar a los animales, éstos aprenden a asociar el ruido blanco como una señal aversiva; lo cual, se ve reflejado en la prueba del condicionamiento al miedo en donde encontramos un mayor porcentaje de inmovilización después de haber presentado el ruido blanco, que en ausencia de éste.

Cruces peligrosos: Para mejorar el entrenamiento de discriminación y evitar que los animales mostraran conductas de escape ante la descarga eléctrica en la discriminación de ensayos, se entrenó a los animales durante 5

días a evitar cruzar por comida en ensayos peligrosos. El objetivo de este entrenamiento fue que los animales aprendieran a generalizar lo aprendido durante el condicionamiento al miedo a la conducta operante de buscar comida guiados por una señal aversiva. Por lo que, a diferencia del entrenamiento de cruces seguros, en este entrenamiento evaluamos el desempeño de los animales mediante el porcentaje de ensayos peligrosos evitados por cada día de entrenamiento. De modo que, se realizó lo siguiente:

Después de hacer la prueba del condicionamiento al miedo, los animales fueron colocados en una de las zonas seguras de la caja de entrenamiento. A continuación, se presentaron ensayos peligrosos, que fueron señalizados por la presencia del ruido blanco y la descarga eléctrica (0.5 mA), así como de la luz continua para indicar la disponibilidad de comida.

En un día de entrenamiento se presentaron 10 ensayos de cruces peligrosos (100% de riesgo) con un intervalo de presentación de 60 a 180 segundos, igual que el periodo interestímulo que se utiliza en el condicionamiento al miedo. Así mismo, para ayudar a los animales a aprender que la descarga eléctrica estaría presente el mismo tiempo que el ruido blanco, el tiempo de duración para todos los ensayos peligrosos fue aumentando paulatinamente conforme avanzaron los días de entrenamiento, de 30 segundos, igual que en el condicionamiento, a 120 segundos; que es un tiempo muy cercano a la máxima de duración de los ensayos en el entrenamiento de discriminación. De modo que, después de los dos primeros días de entrenamiento aumentamos por día 30 segundos más a la duración de los ensayos peligrosos (D1-D2= 30, D3=60 seg, D4= 90, D5=120).

En cada ensayo peligroso se registró el tiempo que tardaron los animales en cruzar y presionar la palanca por comida (latencias de cruces) y el tiempo que tardaron sólo en desplazarse (desplazamientos). Si los animales no cruzaron algún ensayo peligroso, se tomó el tiempo máximo de duración de ensayos establecido por cada día de entrenamiento. De modo que, para el análisis de datos, se tomó en cuenta el número de ensayos peligrosos evitados a lo largo del tiempo (D1-D5).

La figura 4.11A muestra el promedio y error estándar (SEM) del porcentaje de ensayos evitados por cada día de entrenamiento (D1-D5). Se muestra la duración máxima de los ensayos peligrosos, según el día de entrenamiento. Observamos que, durante el primer día de entrenamiento (30 segundos duración), los animales tuvieron menos de la mitad de ensayos evitados (40%). El número de ensayos evitados fueron aumentando conforme avanzaron los días de entrenamiento, a pesar de que el tiempo máximo de duración de los ensayos incrementó. Esto, puede apreciarse en el cuarto día de entrenamiento (D4), en donde tuvieron el 83% de ensayos peligrosos evitados. Se observó un ligero decremento del porcentaje de evitación durante el último día de entrenamiento (D5, 74%). Sin embargo, las diferencias encontradas en el porcentaje de evitación de los ensayos peligrosos conforme avanzaron los días de entrenamiento, resultaron ser estadísticamente significativas; ANOVA (2 vías) de medidas repetidas, $F_{(4,48)} = 5.49$, $p = 0.001$.

El análisis realizado, demostró que sólo el porcentaje de evitación del primer día (D1, 40%) de entrenamiento resultó ser diferente significativamente con respecto al porcentaje de evitación encontrado en los demás días de entrenamiento (D2=79%, $p=0.003$; D3=74%, $p=0.016$; D4=83%, $p=0.001$; D5=74%, $p=0.001$); prueba Post Hoc (Tukey HSD).

Los resultados encontrados durante este entrenamiento sugieren que los animales aprendieron eficazmente a reconocer la presencia de la descarga eléctrica durante todo el tiempo de presentación del ruido blanco; lo cual, se ve reflejado en un incremento de la respuesta de evitación ante el peligro encontrado hacia el final del entrenamiento (Figura 4.11B).

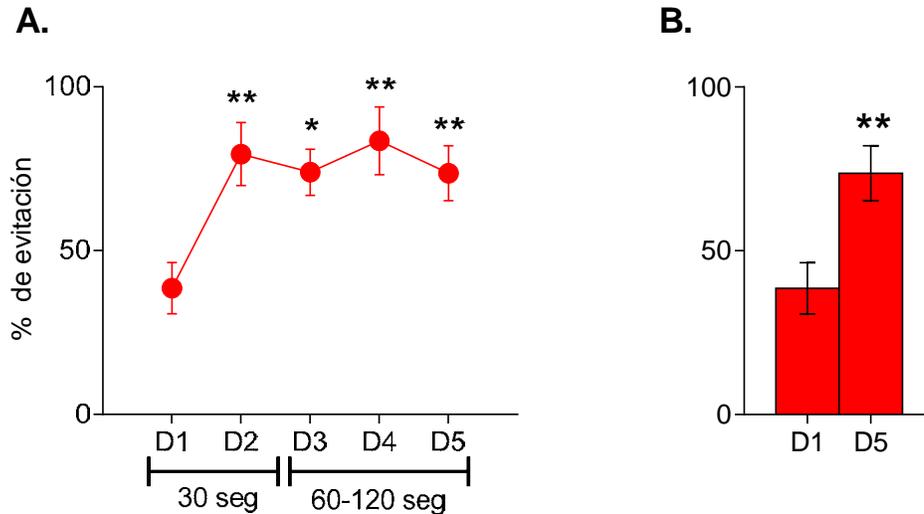


Figura 4.11. Entrenamiento aversivo-peligroso: Cruces peligrosos (n=13). **A)** Se muestra el promedio y error estándar (SEM) del porcentaje de evitación de los ensayos peligrosos indicados por la señal aversiva y la presencia de la descarga eléctrica a lo largo del tiempo (D1-D5). Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de evitación a través del tiempo, $p=0.001$. Una prueba Post Hoc, encontró que sólo el porcentaje de evitación del primer día (D1) de entrenamiento resultó ser diferente significativamente con respecto al porcentaje de evitación encontrado en los demás días de entrenamiento (D2, $**p=0.003$; D3, $*p=0.016$; D4, $**p=0.001$; D5, $**p=0.001$). **B)** Resumen del entrenamiento de cruces peligrosos. La gráfica muestra el promedio y error estándar (SEM) del porcentaje de evitación del primer día (D1) de entrenamiento, comparado con el último día (D5), $*p=0.001$.

III. Entrenamiento de discriminación

Después de que los animales aprendieron a evitar el peligro durante el entrenamiento de cruces peligrosos, hicimos el entrenamiento de discriminación de ensayos. Para mejorar este entrenamiento con respecto al experimento anterior, se colocaron en los bordes de la parrilla, acrílicos que funcionaban como pequeñas bardas o topes (9 cm alto X 29.1 cm ancho) para evitar que los animales censaran con las vibrisas la presencia o ausencia de la descarga eléctrica. De este modo nos aseguramos de que los animales, al final del entrenamiento, identificaran los ensayos peligrosos sólo por la presencia de la señal aversiva-peligrosa.

Otro cambio importante que realizamos fue aumentar la intensidad de la descarga eléctrica conforme avanzaron los días de entrenamiento, lo cual, realizamos para evitar que los animales se habituaran a la intensidad de la descarga eléctrica y comenzaran a cruzar los ensayos peligrosos con rapidez. El porcentaje de riesgo que utilizamos en este experimento fue el mismo porcentaje utilizado en experimentos anteriores (10-30%).

A excepción de los cambios ya mencionados, el procedimiento del entrenamiento de discriminación siguió la misma lógica que el experimento anterior. De modo que, los animales fueron entrenados durante 9 días y en cada día de entrenamiento se les permitió realizar 30 ensayos de cruces distribuidos de manera aleatoria entre ensayos seguros y peligrosos.

El entrenamiento comenzó con una probabilidad de aparición de ensayos peligrosos del 10% y una intensidad de la descarga eléctrica de 0.5 mA, la misma intensidad utilizada en el entrenamiento aversivo-peligroso. Para ambos ensayos se registraron las latencias de cruces y los desplazamientos durante todo el entrenamiento.

Para el análisis de los datos sólo se tomaron en cuenta las latencias de cruces de los primeros 7 ensayos seguros y los primeros 3 ensayos peligrosos; por cada día de entrenamiento. El criterio de discriminación se mantuvo de $p < 0.05$ y éste se evaluó en el último día de entrenamiento (D9).

La figura 4.12A muestra los resultados obtenidos durante el entrenamiento. Se graficó el promedio y error estándar (SEM) de las latencias de cruces de ensayos seguros y ensayos peligrosos a lo largo del tiempo (D1-D9). Como puede observarse, en el primer día de entrenamiento (D1) los animales tuvieron latencias de cruces ligeramente mayores en ensayos seguros (54 seg) que en los ensayos peligrosos (44 seg), las cuales, disminuyeron y fueron similares para ambos ensayos durante el segundo día de entrenamiento (D2, 35 segundos para ambos ensayos). Sin embargo, un día después (D3), comenzamos a ver latencias de cruces mayores en ensayos peligrosos (36 segundos) y latencias de cruces menores en ensayos seguros (20 segundos).

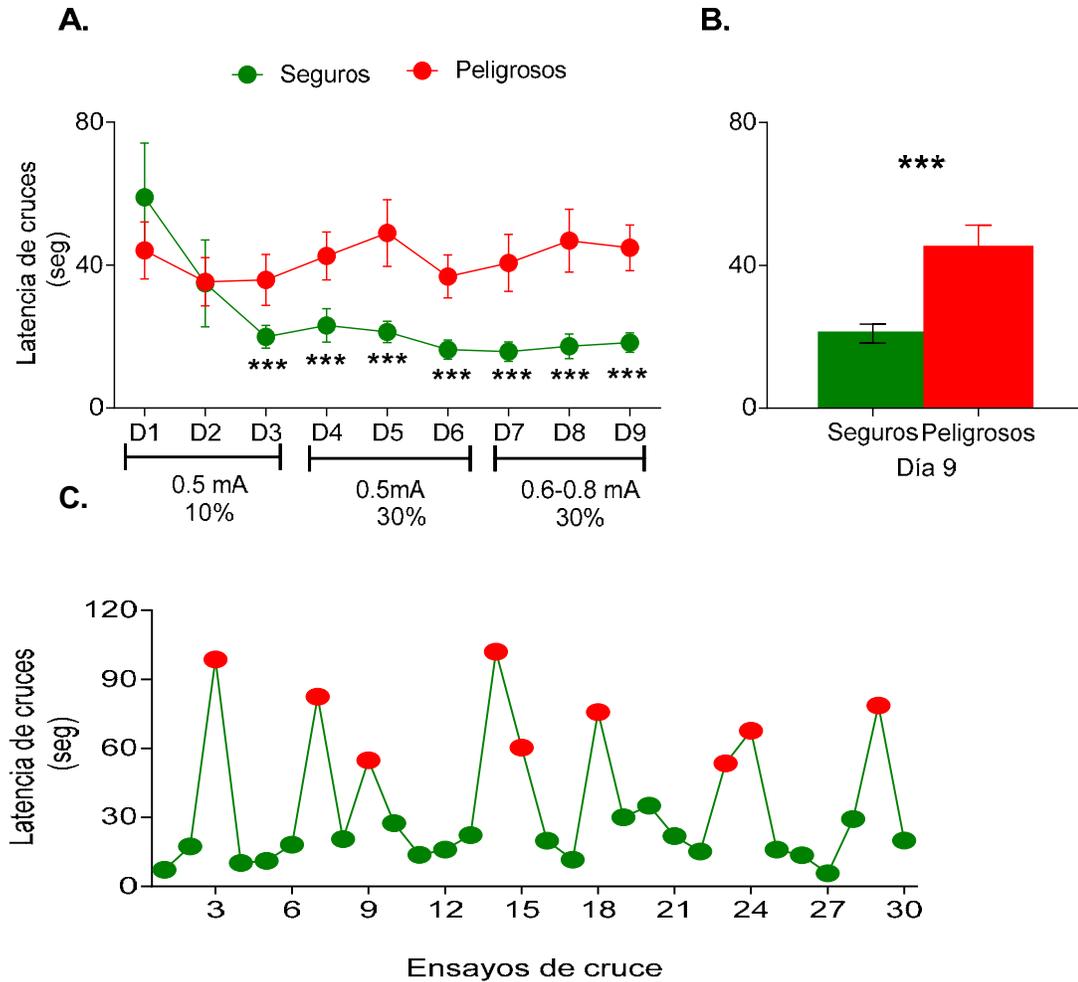


Figura 4.12. Entrenamiento de discriminación (n=13). **A)** La gráfica representa el promedio y error estándar (SEM) de latencias de cruces (seg) en ensayos seguros y ensayos peligrosos a través del tiempo (D1-D9). Se muestra, para cada día, el porcentaje de riesgo y la intensidad de la descarga eléctrica utilizados para entrenar a los animales (D1-D3 10%, 0.5 mA intensidad; D4-D6 30%, 0.5 mA; D7 30%, 0.6 mA; D8 30%, 0.7 mA; D9 30%, 0.8 mA). Se encontraron mayores latencias de cruces (seg) en ensayos peligrosos comparadas con los ensayos seguros. Estas diferencias en las latencias de cruces fueron estadísticamente significativas, $p=0.000$, sobre todo al comparar las latencias de cruces en ensayos seguros del primer día de entrenamiento (D1) versus el tercer (D3), cuarto (D4), quinto (D5), sexto (D6), séptimo (D7), octavo (D8) y noveno día (D9) de entrenamiento (prueba post hoc, $p=***0.000$). **B)** Comparación de las latencias de cruces (seg) en ensayos seguros versus ensayos peligrosos en el último día de entrenamiento (D9). Se encontraron diferencias significativas en las latencias de cruces de ensayos seguros comparadas con las latencias de cruces obtenidas en los ensayos peligrosos; $***p=0.000$. **C)** Ejemplo de una sesión completa de discriminación (30 ensayos). La grafica muestra las latencias de cruces de 30 ensayos distribuidos en seguros y peligrosos, durante el último día de entrenamiento (D9).

Para evitar que las diferencias obtenidas en el tercer día disminuyeran, aumentamos el porcentaje de riesgo a un 30% y continuamos con una intensidad de 0.5 mA en los siguientes tres días de entrenamiento (D4-D6). Aumentar la probabilidad de aparición de los ensayos peligrosos permitió que los animales incrementaran sus latencias de cruce sólo en los ensayos peligrosos, como puede observarse en el quinto día de entrenamiento (D5, 49 segundos).

Un ligero decremento se observó en las latencias de cruces en ensayos peligrosos, durante el sexto día de entrenamiento (D6, 37 segundos); por lo que, a partir del séptimo día (D7) aumentamos la intensidad de la descarga eléctrica 0.1 mA, por día. De modo que, durante el día 7 dimos una intensidad de 0.6 mA, que aumentó a 0.7 mA durante el octavo día de entrenamiento, para así, finalizar el entrenamiento con una intensidad de 0.8 mA en el último día de entrenamiento (D9).

Aumentar la intensidad de la descarga eléctrica durante los últimos 3 días de entrenamiento, permitió que las latencias de cruces en ensayos peligrosos incrementaran y se mantuvieran alrededor de los 45 segundos hasta el final del entrenamiento. Mientras que, las latencias de cruces en ensayos seguros se mantuvieron alrededor de los 20 segundos a partir del tercer día de entrenamiento y hasta último día de éste (D3= 20 seg, D4=23 seg, D5=21 seg, D6=18 seg, D7=17 seg, D8=18 seg, D9=19 seg).

Las diferencias encontradas en las latencias de cruces de ensayos seguros comparados con las latencias de cruces en ensayos peligrosos a lo largo del entrenamiento (D1-D9), resultaron ser estadísticamente significativas; ANOVA (2 vías) de medidas repetidas; $F_{(8,192)} = 3.61$, $p=0.000$. Una prueba Post Hoc (Tukey HSD) encontró diferencias significativas sólo en las latencias de cruces en ensayos seguros, al comparar el primer día de entrenamiento (D1, 54 seg) y el resto de días de entrenamiento (D3= 20 seg, D4=23 seg, D5=21 seg, D6=18 seg, D7=17 seg, D8=18 seg, D9=19 seg); $p=0.000$, a excepción del segundo día (D2=35 seg) en donde no fueron significativas, $p=0.149$.

En cuanto al criterio de discriminación, comparamos el promedio de las latencias de cruces en ensayos seguros versus el promedio de las latencias de cruces obtenidas en ensayos peligrosos del último día de entrenamiento y encontramos diferencias estadísticamente significativas; *t* de Student para muestra pareadas, $t_{(12)} = 4.7$, $p = 0.000$ (Figura 4.12B). Por lo que, el criterio de discriminación establecido para realizar la prueba de inhibición activa del miedo se cumplió en este experimento.

Un ejemplo de una sesión completa (30 ensayos) del entrenamiento de discriminación se muestra en la figura 4.12C. Se graficaron las latencias de cruces de 30 ensayos, distribuidos en seguros y peligrosos, del último día de entrenamiento (D9) de un solo sujeto.

Los resultados obtenidos sugieren que, los animales aprendieron eficazmente a discriminar entre la señal apetitiva y la señal aversiva para indicar la ocurrencia de ensayos seguros y ensayos peligrosos. Lo cual, se ve reflejado en el incremento de las latencias de cruces sólo en los ensayos peligrosos y en la disminución de las latencias de cruces en ensayos seguros a lo largo del entrenamiento. Permittiéndonos así, observar latencias de cruces mayores en ensayos peligrosos que en los ensayos seguros y por ende, la inhibición activa del miedo de los animales ante el peligro.

Esta diferencia en las latencias de cruces no resultó ser consecuencia de que los animales pudieran sentir la presencia de la descarga eléctrica gracias a los topes de acrílico, sino de la señalización del peligro mediante el ruido blanco. Por lo que, después de este entrenamiento los animales estuvieron listos para realizar la prueba de inhibición activa del miedo.

IV. Prueba de inhibición activa del miedo en busca de recompensas

Después de que los animales cumplieron el criterio de discriminación de $p < 0.05$ en el último día de entrenamiento, se realizó una prueba para evaluar la inhibición activa del miedo sólo con la presencia de la señal apetitiva y la señal aversiva para indicar los ensayos peligrosos y seguros.

Para probar la inhibición activa del miedo, durante un día, se colocaron a los animales en una de las zonas seguras de la caja de entrenamiento; a continuación se presentaron ensayos seguros y peligrosos distribuidos aleatoriamente.

Al igual que en el entrenamiento de discriminación, los ensayos seguros fueron señalizados por la luz continua, mientras que, los ensayos peligrosos fueron indicados sólo por la presencia del ruido blanco y la luz continua. Ambos ensayos tuvieron una duración máxima de 180 segundos, si los animales cruzaron hacia la zona segura de la caja con disponibilidad de comida (luz continua) antes de cumplirse este periodo de tiempo, un pellet de se entregó como recompensa para cada tipo de ensayo.

Se permitió que los animales cruzaran un máximo de 30 ensayos, distribuidos de manera aleatoria entre seguros y peligrosos y se estableció un 30% de riesgo para la probabilidad de aparición de los ensayos peligrosos (9 ensayos peligrosos). Para evitar que los animales censaran la ausencia de la descarga eléctrica, se colocaron dos topes de acrílico en las orillas de la parrilla de la caja de entrenamiento.

Para evaluar la inhibición activa del miedo, se registró el tiempo que tardaron los animales en cruzar de una zona segura a otra y presionar la palanca por comida (Latencias de cruces) y el tiempo que tardaron en desplazarse de una zona segura a otra (desplazamientos); para ambos ensayos.

La figura 4.13B, muestra el promedio de las latencias de cruces en los primeros 7 ensayos seguros y el promedio de las latencias de cruces obtenidas en los 3 primeros ensayos peligrosos. Graficamos y comparamos el promedio individual de las latencias de cruces de cada sujeto obtenido durante los ensayos seguros y peligrosos (líneas y puntos grises).

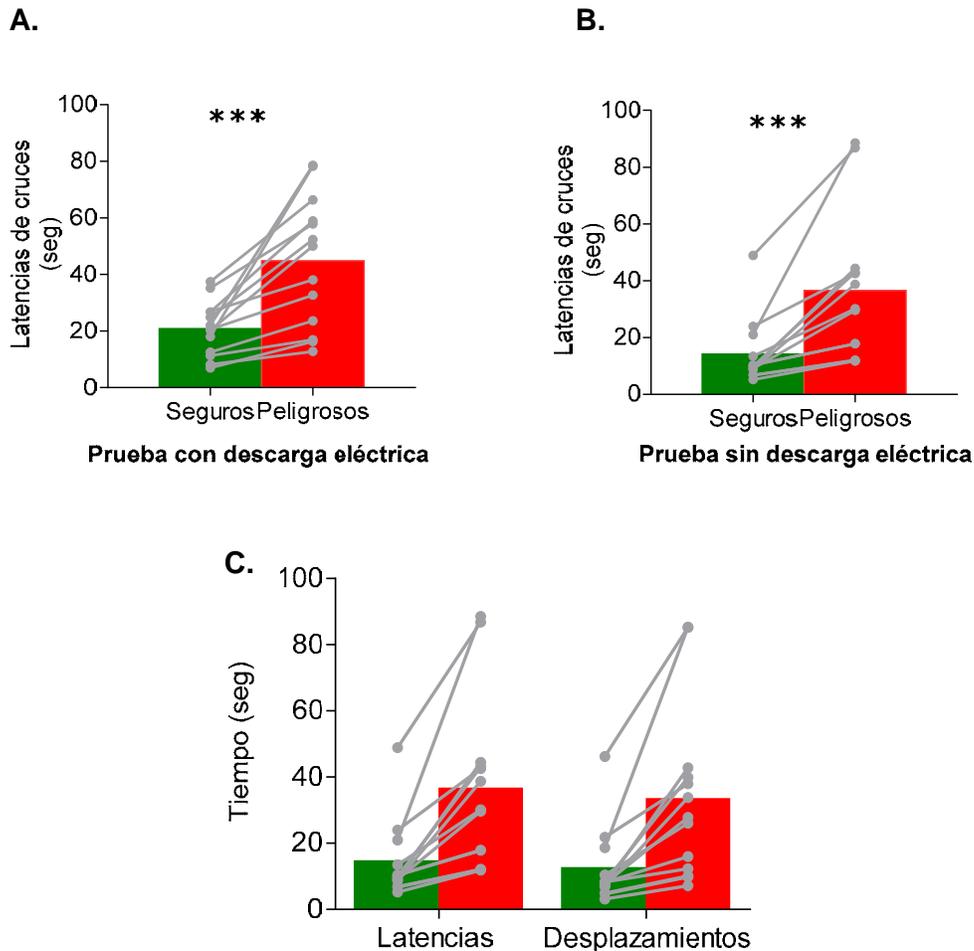


Figura 4.13. Prueba de inhibición activa del miedo en busca de recompensas (n=13). **A)** Prueba con descarga eléctrica, se muestra el promedio de las latencias de cruces en ensayos seguros y peligrosos en el último día de discriminación (D9). Las cuales resultaron ser estadísticamente diferentes al comparar ambas condiciones, $***p=0.000$. Los puntos y líneas grises comparan el promedio individual de las latencias de cruces de las 13 ratas para cada condición (ensayos seguros y peligrosos). **B)** Prueba sin descarga eléctrica, se graficó el promedio de las latencias de cruces en ensayos seguros y ensayos peligrosos presentados en ausencia de la descarga eléctrica. De manera individual se muestra el promedio de las latencias de cruces de todos los animales, comparando los ensayos seguros versus los ensayos peligrosos (líneas y puntos grises). Se encontraron diferencias significativas al comparar los ensayos seguros versus los ensayos peligrosos, $***p=0.000$. **C)** Comparación de las latencias de cruces y el tiempo de desplazamiento en ensayos seguros y peligrosos. No se encontraron diferencias significativas al comparar el tiempo que tardaron los animales en desplazarse y el tiempo que tardaron en presionar la palanca por comida después del desplazamiento en ambos ensayos; $p=0.885$.

Se encontró que, las latencias de cruces en ensayos seguros fueron de 15 segundos, mientras que, las latencias de cruces en ensayos peligrosos fueron de 37 segundos. El promedio individual de las latencias de cruces para cada sujeto, muestra que todos los animales respondieron de manera diferenciada ante los ensayos seguros y peligrosos, sin embargo, en todos se observó un promedio mayor de las latencias de cruces en los ensayos peligrosos con respecto a lo obtenido en ensayos seguros

Las diferencias encontradas en las latencias de cruces, al comparar los ensayos seguros versus los peligrosos, resultaron ser estadísticamente significativas; *t* de Student para muestras pareadas, $t_{(12)} = 4.45$, $p = 0.000$. Lo cual, sugiere que todos los animales inhibieron su miedo activamente ante el peligro; a pesar de que la descarga eléctrica no estuvo presente.

Para evaluar si la inhibición activa del miedo encontrada durante la prueba sin descarga difiere de la inhibición activa del miedo en condiciones en donde la descarga eléctrica estuvo presente, realizamos un ANOVA (2 vías) de medias repetidas y comparamos las latencias de cruces en ensayos seguros y peligrosos durante el último día de discriminación (Figura 4.13A) versus las latencias de cruces obtenidas en ambos ensayos durante la prueba sin descarga. No se encontraron diferencias significativas en la inhibición activa del miedo con presencia y ausencia de la descarga eléctrica; $F_{(1,24)} = .71$, $p = 0.405$. Pero sí se encontraron diferencias significativas entre los ensayos seguros y peligrosos para ambas pruebas analizadas $F_{(1,24)} = 12.15$, $p = 0.001$. Con lo cual, podemos inferir que los animales aprendieron eficazmente a predecir la ocurrencia de los ensayos peligrosos ante la presencia de una señal aversiva/peligrosa y no por la presencia directa de la descarga eléctrica.

Para asegurarnos de que los animales realmente inhibieron activamente su miedo ante el peligro para obtener una recompensa, evaluamos el tiempo que tardaron los animales en desplazarse de una zona segura a otra durante los ensayos seguros y peligrosos. Si los animales no cruzaron de manera azarosa en condiciones seguras y peligrosas, se espera que el tiempo de desplazamiento y las latencias de cruces no difieran entre sí. Los datos de los

desplazamientos en ensayos seguros y peligrosos, se muestran en la figura 4.13C.

Graficamos el promedio grupal de los desplazamientos en los primeros 7 ensayos seguros, comparado con los primeros 3 ensayos peligrosos y lo comparamos con los resultados obtenidos en las latencias de cruces. Se encontró que, en ensayos seguros, el tiempo de desplazamientos de los animales fue de 12 segundos, mientras que, en ensayos peligrosos fue de 34 segundos. Comparado con los resultados obtenidos en las latencias de cruces para ambas condiciones, observamos que en promedio, los animales solo tardaron 3 segundos en presionar la palanca por comida después de haberse desplazado.

La diferencia de tiempo entre los desplazamientos y las latencias de cruces para ambos ensayos, se analizó con un ANOVA (2 vías) de medias repetidas y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas; $F_{(1,24)} = 0.02$, $p = 0.885$, sugiriendo que el impulso apetitivo por la recompensa estuvo presente durante la inhibición activa del miedo y que por ende las latencias de cruces mayores obtenidas en los ensayos peligrosos no se debieron a que los animales no estuvieran motivados a buscar comida.

V. Extinción de la respuesta de inhibición activa del miedo

Al realizar la prueba de inhibición activa del miedo observamos que los animales comenzaron a disminuir notablemente las latencias de cruces y desplazamientos durante los ensayos peligrosos, lo cual, se pudo deber a una posible extinción de la respuesta de inhibición activa del miedo ante el peligro, debido a la continua repetición de la señal aversiva-peligrosa en ausencia de la descarga eléctrica.

Para evaluar la extinción, comparamos las latencias de cruces de los 9 ensayos peligrosos presentados durante la prueba de inhibición activa del miedo (Figura 4.14A). Encontramos que a partir de la tercera presentación del peligro (18 segundos) las latencias de cruces disminuyeron notablemente, respecto a las latencias de cruces obtenidas durante la primera (40 segundos) y segunda presentación del peligro (38 segundos). Esta disminución en las

latencias de cruces continuó durante las presentaciones restantes de ensayos peligrosos (Figura 4.14B).

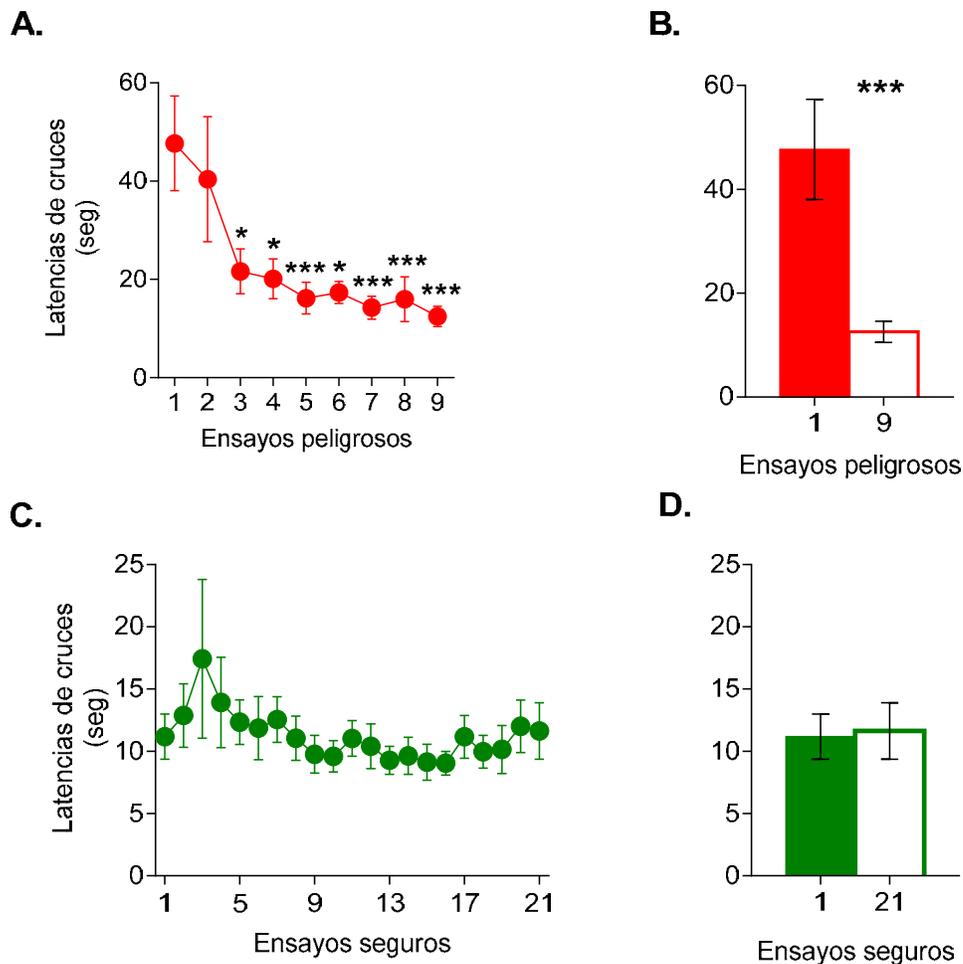


Figura 4.14 Extinción de la respuesta de inhibición activa del miedo (n=13) **A)** La gráfica muestra el promedio de las latencias de cruces a lo largo del tiempo. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas de las latencias de cruces a través de los 9 ensayos peligrosos presentados; *** $p=0.000$. Sobre todo, al comparar el primer ensayo peligroso con respecto a los 7 últimos ensayos; $p < 0.05$ (Tukey HSD). **B)** Resumen de la extinción en la inhibición activa del miedo. La gráfica muestra la comparación de las latencias de cruces del primer ensayo peligroso presentado (1) con respecto al último ensayo (9) presentado; *** $p=0.002$. **C)** Se muestra el promedio y error estándar de las latencias de cruces de los 21 ensayos seguros presentados durante prueba de inhibición activa del miedo sin descarga eléctrica. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las latencias de cruces durante los 21 ensayos seguros presentados; $p=0.313$. **D)** Resumen de la presentación de ensayos seguros. Se compararon las latencias de cruces (seg) del primer ensayo seguro (1) versus el último ensayo seguros presentado (21).

Las diferencias encontradas en las latencias de cruces a través de los 9 ensayos peligrosos fueron estadísticamente significativas; ANOVA (1 vía) de medidas repetidas, $F_{(8,88)} = 5.12$, $p=0.000$. Especialmente, al comparar el primer ensayo peligroso (40 seg) con la tercera (ensayo 3= 18 seg, $p=0.032$), cuarta (ensayo 4=7seg, $p=0.0219$), quinta (ensayo 5= 15 seg, $p= 0.0072$), sexta (ensayo 6=16 seg, $p=0.018$), séptima (ensayo 7=14 seg, $p= 0.005$), octava (ensayo 8 =15 seg, $p =0.008$) y novena (ensayo 9=12 seg, $p= 0.002$) presentación de ensayos peligrosos; según lo arrojado por una Prueba Post Hoc (Tukey HSD).

En cuanto a los ensayos seguros, no observamos cambios significativos en las latencias de cruces de los 21 ensayos presentados durante la prueba de inhibición activa del miedo (ANOVA (1 vía) de medidas repetidas; $F_{(20,240)} = 1.16$; $p=0.313$), como lo muestra la figura 4.14C. De modo que, durante toda la prueba de inhibición activa del miedo, los animales tardaron el mismo tiempo en cruzar los ensayos seguros, alrededor de 10 segundos (Figura 4.14 D).

Los resultados sugieren que los animales comenzaron a extinguir el miedo ante la presencia de los ensayos peligrosos, debido a la repetida presentación de estos en ausencia de la descarga eléctrica; lo cual, se ve reflejado en una disminución significativa de las latencias de cruces en ensayos peligrosos del primer y último ensayo presentado. Pero no así en los ensayos seguros (Figura 4.4 C y D.)

Los resultados encontrados sugieren que, los animales mostraron una inhibición activa del miedo ante una experiencia (ruido blanco) para poder obtener una recompensa, lo cual, se ve reflejado en mayores latencias de cruces para obtener la recompensa en ensayos peligrosos, comparado con las latencias obtenidas en ensayos seguros. Observamos que esta diferencia significativa en ambos ensayos, fue un patrón conductual que mostraron todos los animales. Así mismo, encontramos que no hubo diferencias significativas en la inhibición activa del miedo en ausencia y presencia de la descarga eléctrica; por lo que, podemos inferir que los animales aprendieron eficazmente a asociar el ruido blanco con una experiencia peligrosa.

4.3.4 *Discusión experimento 3*

Durante este experimento, pudimos replicar los resultados obtenidos en el entrenamiento de asociación de la luz continua con la disponibilidad de comida; observamos una preferencia significativa del palanqueo en condiciones con presencia de la luz continua. Sin embargo, observamos en estos animales, que no hubo una preferencia inicial tan alta por palanquear en condiciones oscuras. Creemos que esto pudo deberse a que en este experimento pudimos evaluar una muestra mayor (n=13), comparado con la evaluada durante el experimento anterior (n=6).

Así mismo, pudimos comprobar que después de este entrenamiento, son necesarios sólo 3 días de entrenamiento de cruces seguros para que los animales aprendan a buscar comida guiados por la presencia de la señal apetitiva; y que las mínimas latencias de cruces y desplazamientos que pueden tener los animales, durante este entrenamiento, son alrededor de 9 segundos y 6 segundos respectivamente.

En cuanto al entrenamiento de asociación aversiva-peligrosa, durante la adquisición del condicionamiento al miedo, tratamos de mejorar el porcentaje de inmovilización ante el ruido blanco; así mismo, tratamos de que la descarga eléctrica no dependiera de la temporalidad del ruido blanco. Por lo que, aumentamos días de entrenamiento del condicionamiento y programamos la descarga eléctrica, para que se presentara de manera aleatoria. Sin embargo, contrario a lo esperado, el día de la prueba del condicionamiento se observó un bajo porcentaje de inmovilización (34 %) ante la presencia del ruido blanco y un alto porcentaje de inmovilización durante la ausencia de cualquier estímulo (PRE, <20%), a pesar de que en este experimento expusimos durante más tiempo a los animales sólo al contexto. Aún así, encontramos diferencias significativas ante la ausencia y presencia del ruido blanco, lo que nos permitió continuar con el entrenamiento.

Otro cambio importante que realizamos durante el entrenamiento de la señal aversiva peligrosa, fue entrenar a los animales a evitar el peligro antes que enseñarlos a discriminar; por lo que, al igual que en el entrenamiento apetitivo-seguro, les presentamos durante varios días ensayos de cruces

únicamente peligrosos. Se observó que los animales aprendieron a detectar el peligro, respondiendo con un incremento del porcentaje de ensayos evitados a lo largo del entrenamiento.

En cuanto a la discriminación de ensayos, creemos que todas las modificaciones realizadas en el entrenamiento aversivo-peligroso permitieron que los animales logaran discriminar efectivamente y de manera significativa entre una condición segura y una peligrosa (criterio de discriminación $p < 0.05$). Lo cual, pudo observarse a partir del tercer día de entrenamiento en donde las latencias de cruces para ambos ensayos comenzaron a separarse, teniendo latencias de cruces mayores en los ensayos peligrosos.

Detectamos también que, es importante en este entrenamiento no sólo aumentar el porcentaje de riesgo conforme a lo días de entrenamiento, sino también, variar con las diferentes intensidades aversivas de la descarga eléctrica para evitar que la respuesta en los ensayos peligrosos disminuya debido a una habituación de la descarga eléctrica. Encontramos así que, hasta con una intensidad alta de 0.8 mA permite que los animales inhiban su miedo activamente ante el peligro para obtener una recompensa.

Otro dato importante que observamos en este entrenamiento fue que las latencias de cruces en ensayos seguros se mantuvieron constantes a lo largo del entrenamiento; a pesar de las modificaciones realizadas para manipular los ensayos peligrosos. Con lo cual, podemos inferir una clara asociación de las señales ambientales con su respectiva consecuencia apetitiva o aversiva y por ende un eficiente aprendizaje en la discriminación de ensayos seguros y peligrosos.

Esta discriminación no fue consecuencia de que los animales detectaran la presencia de la descarga eléctrica debido a los topes de acrílico utilizados para evitar que los animales censaran la presencia o ausencia de ésta; lo cual pudo verse reflejado en el día de prueba de la inhibición activa del miedo donde, a pesar de que no estuvo presente la descarga eléctrica, los animales tuvieron latencias similares a lo encontrado en el entrenamiento de discriminación.

La prueba de inhibición activa del miedo fue evaluada por primera vez, en este experimento y encontramos diferencias significativas en las latencias de cruces entre ensayos seguros y peligrosos. Esta diferencia sugiere que los animales inhibieron su miedo activamente a una experiencia peligrosa para obtener una recompensa.

Las latencias de cruces encontradas en ensayos peligrosos y latencias menores durante ensayos seguros, no difirieron significativamente de lo obtenido durante la prueba con presencia de la descarga eléctrica. Así mismo, observamos que la distribución de los animales de manera individual para ensayos seguros y peligrosos indica que cada animal responde de manera diferente ante el peligro. En algunos animales se observó que las latencias de cruces superaron los 60 segundos, mientras que, en otros se vieron latencias de cruces inferiores a los 20 segundos. Sin embargo, a pesar de estas diferencias individuales en todos los animales observamos el mismo patrón de inhibición activa del miedo (mayores latencias en ensayos seguros). Lo cual puede hablarnos de características específicas de cada sujeto, para regular el miedo en condiciones en donde hay una recompensa disponible.

De igual modo, encontramos que las latencias de cruces mayores en ensayos peligrosos no se debieron a que los animales no estuvieran hambrientos, o motivados por el impulso apetitivo de la recompensa; lo cual corroboramos con la comparación de las latencias de cruces y desplazamientos en ambos ensayos.

Por último, encontramos que la extinción de la inhibición activa del miedo es un proceso rápido que puede observarse a partir del tercer ensayo peligroso que se presenta sin descarga eléctrica.

A modo de conclusión, podemos inferir que la estandarización de la tarea conductual para la inhibición activa del miedo se logró después de 3 experimentos probados con diferentes parámetros y entrenamiento conductuales. Así mismo estos experimentos nos permitieron diseñar un protocolo conductual estable y reproducible para estudiar la inhibición activa del miedo en busca de recompensas (Tabla 4.1).

Etapa	Subetapa	Días	Parámetros	Repuesta conductual
Entrenamiento apetitivo	1.- Asociación luz-comida	6	Ensayos con luz: 5-20 palanqueos/min Ensayos sin luz: 30- 180 seg	Palanqueo/min (luz/no luz)
	2.-Cruces seguros	5	Luz continua Duración máxima= 180 seg	Latencias de cruces (seg)
Entrenamiento aversivo	1.-Condicionamiento al miedo: -Exposición al contexto - Adquisición del Condicionamiento aleatorio	6	5 Presentaciones EC-EI: EC: Ruido blanco, 30 segundos, 85db EI: Descarga eléctrica de 0.5 mA, durante 1 seg	% de inmovilización
	2.-Prueba de Condicionamiento	1	Prueba de condicionamiento 2 presentaciones EC: ruido blanco, 30 seg, 85db	% de Inmovilización
	3.-Cruces peligrosos	5	0.5 Intensidad de descarga eléctrica Ruido blanco 85 db Duración máxima (30-120 seg)	% de evitación
Discriminación de ensayos	1.-Baja intensidad bajo riesgo.	3	0.5 mA, 10% de riesgo	Latencias de cruces (seg)
	2.-Baja intensidad, mediano riesgo.	3	0.5 mA, 30% d riesgo	
	3.- Mediana intensidad, mediano riesgo.	1	0.6 mA, 30% de riesgo	
	4.- Alta intensidad, mediano riesgo.	1	0.7 mA, 30% de riesgo	

	5.- PrePba	1	0.8 mA, 30% de riesgo	
Prueba de inhibición activa del miedo	Prueba sin descarga eléctrica		Sin descarga eléctrica, 30% de riesgo	Latencia de cruces (seg)

Tabla 4.1. Protocolo conductual de la inhibición activa del miedo en busca de recompensas. Se describe brevemente, por etapa conductual, los parámetros de entrenamiento, los días, y la respuesta conductual para evaluar el desempeño de los animales durante el entrenamiento de inhibición activa del miedo en busca de recompensas.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Debido a que no existen tareas conductuales que permitan estudiar los mecanismos cerebrales de la inhibición activa del miedo en busca de recompensas, el objetivo de este proyecto fue desarrollar y estandarizar la primera tarea conductual para estudiar cómo se regula el miedo en condiciones en donde hay una recompensa disponible. Nuestra tarea conductual consiste en simular un conflicto motivacional en donde dos estímulos, uno aversivo y otro apetitivo, compiten por regular la conducta de los animales, tal como ocurre en la naturaleza. De modo que, se desafía a los animales a elegir acercarse a una recompensa (comer) a pesar de la existencia de un peligro inminente (temer).

El desafío conductual de comer a pesar del miedo se desarrolló en un equipo automatizado y programable que consiste en una caja rectangular de plexiglás dividida en tres compartimentos. Dos de los compartimentos de la caja fueron utilizados como zonas seguras, en donde nunca se presentó la descarga eléctrica y los animales pueden recibir comida al presionar una palanca. Por su parte, la zona central de la caja está conformada por una parrilla de acero inoxidable diseñada para entregar descargas eléctricas en las patas de los animales.

Debido a que estábamos interesados en conocer cómo las experiencias aversivas o apetitivas pueden dirigir la conducta emocional de los animales, utilizamos dos estímulos ambientales para ser asociados con la disponibilidad de comida y con la presencia de una descarga eléctrica. De este modo, los animales aprendieron a predecir en qué zona segura de la caja estuvo disponible la comida y en qué momento fue seguro (ensayos seguros sin descarga eléctrica) o peligroso (ensayos peligrosos con descarga eléctrica) cruzar por ella. En ambas condiciones, ensayos seguros y peligrosos, se evaluó el tiempo en que tardaron los animales en cruzar por la comida (latencias de cruces). Se tomó como una medida operacional de la inhibición

activa del miedo para obtener una recompensa las latencias de cruces mayores en ensayos peligrosos que en los seguros.

Encontramos que, a pesar de que aprendieron a predecir la ocurrencia de un evento peligroso, la mayoría de los animales respondieron inhibiendo su miedo activamente y enfrentando una experiencia peligrosa para poder obtener la recompensa. Lo cual, se vio reflejado en latencias de cruces mayores en ensayos peligrosos que en ensayos seguros obtenidos en una prueba de inhibición activa del miedo (ver figura 4.13B). Para poder obtener esta diferencia de latencias en ensayos seguros y peligrosos, es decir que los animales inhibieran activamente su miedo, fue necesario realizar 3 experimentos con diferentes parámetros y entrenamientos conductuales. Siendo el último experimento, el que nos permitió desarrollar un protocolo conductual fiable para estudiar la inhibición activa del miedo en busca de recompensas.

A lo largo de la presentación de los resultados se fue incluyendo una sección de discusión en la que se plantearon los logros y las fallas de cada experimento sin profundizar en el análisis conductual de cada fase. A continuación se discutirán los mecanismos conductuales de la inhibición activa del miedo en condiciones en donde hay una recompensa disponible, tomando en cuenta las leyes establecidas que rigen la modificación de la conducta. Finalmente se discutirán en una sección de perspectivas los posibles mecanismos cerebrales que subyacen a la conducta de inhibición activa del miedo en busca de recompensas.

5.1 Mecanismos conductuales de la inhibición activa del miedo en busca de recompensas

Durante la implementación de la tarea conductual de temer o comer, encontramos que son necesarios al menos tres entrenamientos conductuales para que los animales aprendieran a inhibir activamente su miedo y obtener una recompensa basados en los principios conductuales del condicionamiento clásico e instrumental. Dos de los entrenamientos conductuales consistieron en la asociación de dos estímulos ambientales con una consecuencia apetitiva o

segura, y una consecuencia aversiva o peligrosa (entrenamiento apetitivo-seguro y entrenamiento aversivo-peligroso). Mediante estos estímulos, y su respectiva asociación motivacional, entrenamos a los animales en la búsqueda de recompensas. Mientras que, el tercer entrenamiento (discriminación de ensayos) consistió en la discriminación de ensayos seguros y peligrosos que fueron señalados por los estímulos previamente asociados. Éstos estímulos permitieron indicar a los animales en qué momento fue seguro o peligroso acercarse a la recompensa, para después poder evaluar el conflicto motivacional de elegir comer a pesar del peligro en una prueba de inhibición activa del miedo. A raíz de estos entrenamientos se discutirán los parámetros conductuales más importantes que permitieron la implementación de un protocolo conductual fiable para estudiar la inhibición activa del miedo en busca de recompensas.

5.1.1 Entrenamiento apetitivo-seguro: uso de reforzadores primarios y estímulos discriminativos

Para entrenar a los animales a asociar un estímulo ambiental con una consecuencia apetitiva utilizamos procedimientos conductuales del condicionamiento instrumental. Mediante el condicionamiento instrumental, entrenamos a los animales a presionar una palanca (respuesta instrumental) para obtener una recompensa o reforzador. En la mayoría de los entrenamientos instrumentales suelen utilizarse reforzadores primarios para incrementar una respuesta instrumental específica (Iversen and Lattal 1991). Los reforzadores primarios son estímulos que de manera natural tienen una importancia biológica para la supervivencia de los animales, como la comida, el agua y estímulos relacionados con la conducta sexual. El reforzador primario que más se utiliza en el condicionamiento instrumental es la comida (Iversen and Lattal 1991, Chance 2003). Por lo que, decidimos utilizar comida en pellets de 45 mg como reforzadores o recompensas.

Otro aspecto importante en el condicionamiento instrumental, es el uso de Estímulos Discriminativos (E+) para condicionar la respuesta instrumental de palanqueo (Tarpy and Bourne 1982, Domjan, Grau et al. 2010). Un E+ es un estímulo ambiental, como luces, sonidos, olores y claves contextuales, que

controlan el desempeño de la conducta instrumental al señalar la disponibilidad o ausencia del reforzamiento (Domjan, Grau et al. 2010). Para nuestra tarea conductual, optamos por utilizar una luz amarilla continua como E+ para entrenar a los animales durante el entrenamiento apetitivo.

El uso del E+ durante el moldeamiento de la respuestas instrumental, por lo general, es suficiente para que los animales aprendan a presionar la palanca solo cuando éste se encuentra presente (Silverman 1978, Domjan, Grau et al. 2010). Durante el entrenamiento apetitivo, del primer experimento realizado, nos dimos cuenta de que la presentación del E+ sólo durante el moldeamiento no era suficiente para que los animales aprendieran a cruzar por comida guiándose por esta señal apetitiva (ver figura 4.1). Por lo que, fue necesario implementar un entrenamiento conductual, entrenamiento luz-comida, para mejorar la asociación de la luz continua amarilla con la disponibilidad de comida.

El entrenamiento luz-comida consistió en presentar ensayos aleatorios en donde estuvo presente el E+ (presencia de la luz) y ensayos en donde no lo estuvo (ausencia de la luz); se reforzó el palanqueo de los animales sólo en presencia del E+. Con este entrenamiento fue posible que los animales incrementaran la respuesta instrumental de palanqueo cuando el E+ se presentó y que disminuyera cuando el E+ estuvo ausente, es decir, que los animales aprendieran a presionar la palanca por comida sólo en presencia de la luz continua amarilla y no en ausencia de ésta (ver figuras 4.4 y 4.8).

Este tipo de entrenamiento conductual ya se ha implementado en algunos estudios instrumentales en donde se ha tratado de evaluar que tanto un E+ puede controlar la conducta instrumental (Chance 2003, Domjan, Grau et al. 2010). En uno de estos estudios se presentó de manera aleatoria ensayos con presencia y ausencia del E+, en los cuales, sólo se reforzaba la respuesta instrumental cuando el E+ estuvo presente. Con lo cual, al igual que nosotros, consiguieron un incremento y decremento de la respuesta instrumental en función de la presencia o ausencia del E+ (Jenkins and Harrison 1960).

En conjunto, podemos estar seguros de la funcionalidad de los procedimientos conductuales utilizados para entrenar a los animales a asociar una luz continúa amarilla como una señal apetitiva. Esta asociación fue de vital importancia dado nuestro interés particular en que los animales aprendieran a cruzar por la comida guiándose por una señal apetitiva.

5.1.2 Entrenamiento aversivo-peligroso: uso del condicionamiento clásico

Para el entrenamiento aversivo-peligroso utilizamos los procedimientos conductuales del condicionamiento clásico al miedo, con el cual, entrenamos a los animales a asociar un estímulo ambiental (EC) con un estímulo naturalmente aversivo (EI). Para el condicionamiento al miedo fue necesario probar diferentes estímulos y parámetros conductuales para mejorar la asociación EC-EI en los animales, los cuales se discutirán a continuación:

a) Elección del EC correcto

En el primer experimento realizado utilizamos una luz amarilla intermitente como EC. Varios estudios de condicionamiento al miedo han reportado el uso de estímulos visuales como ECs y han encontrado que resultan buenos estímulos para ser asociados con estímulos naturalmente aversivos (Silverman 1978, Kim and Jung 2006, Domjan, Grau et al. 2010). En nuestro condicionamiento al miedo, el uso de la luz intermitente como EC tuvo buenos resultados para ser asociado con el EI (ver figura 4.2). Sin embargo, en entrenamientos posteriores, los animales no lograron discriminar entre la luz intermitente como señal aversiva y la luz continua como señal apetitiva al ser presentadas de manera simultánea (ver figura 4.3). De modo que, fue necesario utilizar un estímulo con diferente entrada sensorial para ser utilizado como EC.

Elegimos utilizar un estímulo auditivo, como el ruido blanco, para ser asociado con un estímulo aversivo. El ruido blanco utilizado como EC en nuestros condicionamientos, al igual que en otros estudios de condicionamiento al miedo (Servatius and Shors 1994, Maren, Yap et al. 2001), resultó ser eficaz para predecir la ocurrencia de un evento aversivo y para que

los animales aprendieran a discriminarlo como una señal aversiva (ver figura 4.7).

b) Elección del EI correcto

Como estímulo naturalmente aversivo utilizamos una descarga eléctrica. Las descargas eléctricas como EI son muy populares en los estudios de condicionamiento al miedo (LeDoux 2000, Kim and Jung 2006, Johansen, Cain et al. 2011), porque además de resultar aversivas para los animales, tienen grandes ventajas para ser manipuladas como estímulos aversivos. Por ejemplo, una descarga eléctrica puede ser regulada con gran precisión y su intensidad puede ajustarse para evitar ocasionar un daño físico en los animales (Domjan, Grau et al. 2010).

Una característica importante a considerar en los EIs es su intensidad. En diferentes procedimientos de condicionamiento clásico se ha observado que las RCs más fuertes se obtienen cuando se emplean EIs más intensos (Tarpay and Bourne 1982, Chance 2003, Domjan, Grau et al. 2010). La intensidad de los EIs es un elemento clave en la saliencia o notoriedad de los estímulos que permite que éstos sean más significativos para los animales, lo cual, facilita el aprendizaje del condicionamiento clásico (Mackintosh 1994). Por lo que, la intensidad de EI utilizada en nuestros entrenamientos conductuales de miedo y peligro, fluctuó en un rango de 0.5 mA a 0.8 mA.

Observamos que este rango de intensidad (0.5 mA-0.8 mA) del EI no fue ni muy bajo como para no ser significativo para los animales, ni muy alto como para causar daños en los mismos. De hecho, nuestro rango de intensidades de la descarga eléctrica corrobora con otro estudio de condicionamiento al miedo en donde se evaluaron diferentes intensidades de la descarga eléctrica y su relación con los niveles de inmovilización de los animales; en el cual, utilizaron un rango de intensidad de 0.4 mA a 0.8 mA (Young and Fanselow 1992). Así pues, nuestro rango de intensidades utilizadas en los entrenamientos del condicionamiento y peligro está dentro de lo utilizado por otros estudios que han tenido éxito condicionando a los animales.

Sin embargo, a pesar de que utilizamos una correcta intensidad del EI, en la mayoría de nuestros condicionamientos al miedo no obtuvimos altos porcentajes de inmovilización ante la presencia del EC (ver figura 4.6). Para mejorar el porcentaje de inmovilización de los animales, a lo largo de los experimentos realizados, se hicieron varias modificaciones en el condicionamiento al miedo (se discutirán más adelante, en la sección de perspectivas futuras) sin ningún resultado efectivo. En futuros experimentos es necesario que se exploren más intensidades de la descarga eléctrica para evaluar qué rango de intensidad nos permite mejorar los niveles de inmovilización sin perjudicar la respuesta de inhibición activa del miedo en busca de recompensas.

c) Contingencia y Contigüidad

Por otra parte, como se mencionó al inicio de esta tesis, un factor importante en los entrenamientos de condicionamiento clásico al miedo es la relación de contigüidad y contingencia de los estímulos. En todos nuestros condicionamientos al miedo tratamos de respetar la relación de contigüidad y de contingencia realizando lo siguiente: durante 5 veces presentamos la relación EC-EI en el 100% de las veces (contingencia), así como también el EI fue presentado al menos 0.5 segundos antes de la terminación del EC (contigüidad). Lo cual, es un procedimiento realizado en la mayoría de los entrenamientos reportados de condicionamiento al miedo (Iversen and Lattal 1991, Levin and Buccafusco 2006, Johansen, Cain et al. 2011). Sin embargo, el que siempre se presente el EI hacia el final del EC puede provocar una asociación temporal de los estímulos. Es decir, que los animales aprendan a responder ante el EC sólo hasta el final de su presentación y no durante toda su exposición del EC. Una asociación temporal entre el EC y EI fue un problema que observamos en la mayoría de nuestros animales durante los primeros experimentos realizados para estandarizar la conducta. Para evitar este problema, programamos la presentación del EI de manera aleatoria; es decir, para que se presentara al inicio, en medio o al final de la presentación del EC. Con lo cual, no se violó la relación de contigüidad y evitamos la variable de temporalidad que afectaba nuestros entrenamientos posteriores como la

discriminación de ensayos. De hecho, este procedimiento de aleatoriedad del EI ya había sido reportado previamente por un estudio interesado en evitar precisamente las variables de temporalidad durante el condicionamiento al miedo (Peña, Engineer et al. 2013).

5.1.3 Entrenamiento aversivo-peligroso: uso del condicionamiento instrumental

Después de que los animales aprendieron la asociación EC-EI, el siguiente paso fue entrenarlos a evitar el peligro antes de pasar al entrenamiento de discriminación. Para lo cual, utilizamos los procedimientos conductuales del condicionamiento instrumental y diseñamos el entrenamiento de cruces peligrosos. A continuación se discutirán los elementos más importantes del entrenamiento de cruces peligrosos de acuerdo a los ya establecido por el condicionamiento instrumental.

a) Generalización del condicionamiento al miedo

El objetivo del entrenamiento de cruces peligrosos fue que los animales aprendieran a generalizar lo aprendido durante el condicionamiento al miedo a la conducta instrumental de buscar comida guiados por el EC. Para este entrenamiento, presentamos a los animales ensayos de cruces peligrosos con un porcentaje del 100% del riesgo. Los cruces peligrosos estuvieron señalizados por el ruido blanco junto con la descarga eléctrica (EC-EI), al igual que, por la presencia del E+ para indicar en qué lado de la caja estaría disponible la comida. Así, siempre que los animales cruzaran por comida recibieran la descarga eléctrica. Gracias a este entrenamiento, fue posible que los animales mejoraran la relación del EC con el EI extrapolado a la conducta instrumental de buscar comida. Así mismo logramos disminuir la conducta de escape que la mayoría de los animales tuvieron al iniciar los entrenamientos de discriminación.

b) Uso de reforzadores y castigos

El entrenamiento de cruces peligroso puede ser interpretado de dos maneras, por un lado, es posible que los procedimientos utilizados en este entrenamiento estén relacionados con las contingencias negativas de los

procedimientos instrumentales de evitación. En estos procedimientos, como ya se ha mencionado, el reforzamiento negativo de una respuesta instrumental finaliza o previene la entrega de un estímulo aversivo (Chance 2003, Domjan, Grau et al. 2010). En nuestro entrenamiento la respuesta instrumental a incrementar, después de la asociación EC-EI, fue la evitación de los cruces peligrosos; es decir, que los animales dejaran de cruzar. Mientras que, el reforzador negativo que permitió el incremento de la respuesta instrumental fue la evasión de la descarga eléctrica. Por lo que, es posible que nuestro entrenamiento esté relacionado con los procedimientos de evitación pasiva del miedo, en donde los animales aprenden a dejar de hacer algo específico a fin de evitar un evento aversivo (Silverman 1978, Kim and Jung 2006).

La otra forma en que pudiera ser interpretado el entrenamiento de cruces peligrosos es mediante los procedimientos instrumentales que disminuyen la frecuencia de ocurrencia de una respuesta instrumental, es decir, mediante el castigo positivo. En los procedimientos de castigo positivo, como se describió previamente, la realización de una respuesta instrumental produce la entrega de un estímulo aversivo (Pearce and Pearce 1997, Chance 2003, Domjan, Grau et al. 2010). En nuestro entrenamiento, la respuesta instrumental que disminuyó con el castigo positivo fue el escape de los animales al iniciar el EC; es decir que cruzaran de manera inmediata al escuchar el ruido blanco. Mientras que, el castigo positivo que permitió el decremento de la conducta de escape fue la descarga eléctrica; que siempre fue consecuente con la conducta de escape. Los efectos del castigo positivo también han sido explicados como parte del entrenamiento de la evitación pasiva del miedo (Levin and Buccafusco 2006). De modo que, es posible que los resultados encontrados con nuestro entrenamiento de cruces peligroso tengan mucho que ver con los efectos positivos (incremento de la evitación del peligro) y negativos (decremento de la conducta de escape) de ambos procedimientos instrumentales.

En conjunto, podemos concluir que los procedimientos conductuales utilizados en el entrenamiento de la señal aversiva peligrosa fueron óptimos para asociar al ruido blanco como el predictor de un peligro inminente. En el condicionamiento al miedo el uso del ruido blanco funcionó correctamente

como EC y mejoró notablemente como señal aversiva en entrenamientos posteriores. Observamos también bajos niveles de la RC durante el condicionamiento al miedo, sin embargo, el haber realizado el entrenamiento de los cruces peligrosos pareció haber ayudado a la asociación de este estímulo con la descarga eléctrica. Lo cual se vio reflejado en los procedimientos de discriminación.

5.1.4 Entrenamiento de discriminación

El entrenamiento de discriminación de ensayos seguros y peligrosos somete a los animales por segunda vez al conflicto motivacional entre estímulos apetitivos y aversivos (ensayos peligrosos), que compitieron por regular la conducta de aproximación a las recompensas y evitación del peligro de los animales. La primera vez que se presentó el conflicto motivacional a los animales fue en los cruces peligrosos, donde la motivación aversiva fue tan alta (100% de riesgo) que no permitió que los animales inhibieran activamente su miedo. En la discriminación de ensayos, a diferencia de los cruces peligrosos, se tuvo que jugar con un balance motivacional entre el peligro y la recompensa que permitiera la expresión de la inhibición activa del miedo de los animales. Dicho de otro modo, que el peligro no fuera lo suficientemente alto o bajo como para evitar que los animales inhibieran activamente su miedo.

La manera en como controlamos el balance motivacional entre el peligro y la recompensa fue mediante la probabilidad de presentación de los ensayos peligrosos (porcentaje de riesgo) y con la intensidad de la descarga eléctrica. Encontramos que, es necesario que la discriminación inicie con un bajo porcentaje de riesgo (10%) y con una baja intensidad de la descarga eléctrica (0.5 mA). Esto permitió que los animales cruzaran por la recompensa aún en presencia del peligro.

De igual modo, observamos que es necesario el incremento gradual del porcentaje de riesgo y de la intensidad de la descarga eléctrica para evitar la habituación de los animales a los estímulos aversivos. Esto corrobora con un estudio reciente, realizado por Orsini y colaboradores, en donde utilizaron el incremento gradual de la probabilidad de aparición de un estímulo aversivo

(riesgo) para entrenar a animales en una tarea de costo-beneficio. En este estudio, probaron con un intervalo de probabilidad del riesgo de 0 al 100%, siendo el 100% de riesgo el que más efectos tuvo sobre la conducta de elección de los animales (Orsini, Trotta et al. 2015). En nuestro entrenamiento, fue necesario aumentar la intensidad de la descarga eléctrica de 0.5mA a 0.8mA y el porcentaje de riesgo del 10 al 30% para lograr que los animales incrementaran sus latencias de cruces sólo en los ensayos peligrosos (ver figura 4.12), permitiéndonos evaluar por primera vez la inhibición activa del miedo en busca de una recompensa.

En resumen, los tres entrenamientos conductuales y sus respectivos parámetros de presentación de los estímulos fueron cruciales para lograr que los animales aprendieran primero a diferenciar entre lo seguro y lo peligroso y después, a inhibir su miedo activamente ante el peligro a fin de conseguir una recompensa.

A continuación se discutirán los mecanismos conductuales de la prueba de inhibición activa del miedo y su posible extinción.

5.1.5 Prueba de inhibición activa del miedo para obtener una recompensa

La prueba de inhibición activa del miedo fue realizada para comprobar el aprendizaje de los animales en la inhibición activa del miedo para obtener una recompensa. Es decir, que la diferencia de latencias de cruces encontrada durante la discriminación se debiera a la presencia de una señal aversiva y no a la presencia de la descarga eléctrica.

Como se mencionó al inicio de esta discusión, encontramos que aún sin la presencia de la descarga eléctrica los animales tardaron más tiempo en cruzar por comida cuando los ensayos fueron indicados por la señal aversiva. De modo que, los animales aprendieron eficazmente a inhibir activamente su miedo a una experiencia peligrosa guiándose sólo por la presencia del ruido blanco.

Para realizar la prueba de inhibición activa del miedo utilizamos el mismo porcentaje de riesgo (30%) presentado durante el último día de discriminación,

para lo cual, nos basamos un estudio conductual en donde se reportó la utilización de la intensidad mayor del estímulo aversivo presentado en el último día de entrenamiento para la probar la conducta (Holec, Pirot et al. 2014).

Así pues, decidimos utilizar el 30% de riesgo durante la prueba de inhibición activa del miedo. Además de lo ya reportado por otro estudio, utilizamos este porcentaje de riesgo debido a que creímos que disminuirlo o aumentarlo podría ocasionar anormalidades en la respuesta inhibición activa del miedo. Por ejemplo, era probable que si disminuíamos el porcentaje de riesgo a menos del 30% los animales cruzarán más rápido en los ensayos peligrosos; debido a una posible habituación al peligro. Por otro lado, aumentar el porcentaje de riesgo podría haber provocado que los animales dejaran de cruzar por la comida; debido a una alta aversión en el peligro. Por lo que, la mejor opción fue realizar la prueba utilizando el ultimo porcentaje de riesgo utilizado un día anterior en la discriminación.

5.1.6 Extinción de la respuesta de inhibición activa del miedo

Mediante nuestra tarea conductual, también fue posible estudiar una posible extinción de la respuesta de inhibición activa del miedo. La extinción se define como el debilitamiento de una RC cuando el EI se deja de presentarse acompañado del EC (Pavlov and Anrep 1927).

Nuestros resultados, corroboran con la mayoría de los resultados encontrados en los entrenamientos de extinción del condicionamiento al miedo. En los cuales, se ha observado el debilitamiento de la RC a partir de las primeras tres presentaciones del EC en ausencia del EI (Quirk and Mueller 2008). La rápida disminución de la respuesta de inhibición activa del miedo durante la prueba puede tener una significancia adaptativa. Dado que los animales están motivados a buscar la comida, el que exista un peligro para obtenerla compete claramente con su alta necesidad de alimentarse. Siendo mejor adaptativamente hablando, que los animales aprendan rápidamente a extinguir la necesidad de tardar más tiempo en cruzar por la comida cuando ya

no hay un peligro. En nuestra tarea conductual, haría falta realizar más entrenamientos y pruebas de extinción para abordar mejor este fenómeno.

En resumen, podemos concluir que para que un animal aprenda a resolver exitosamente el reto motivacional de temer o comer, es necesario que primero adquiera el aprendizaje asociativo sobre qué estímulos ambientales predecirán consecuencias apetitivas y aversivas. Dichas asociaciones están reguladas por los mecanismos conductuales del condicionamiento clásico e instrumental, que al parecer, deben ser adquiridos en entrenamientos independientes. Una vez que los animales aprenden a asociar qué estímulos ambientales señalizan un evento positivo o negativo, pueden aprender a detectar y diferenciar la existencia de un peligro inminente que los rete motivacionalmente a elegir entre su hambre o su miedo a una experiencia peligrosa.

5.1.7. Teoría de los dos procesos y la inhibición activa del miedo en busca de recompensas

Al igual que en las tareas de evitación activa del miedo, los mecanismos conductuales de la inhibición activa del miedo para conseguir una recompensa pueden ser explicados por la teoría de los dos procesos. La teoría de los dos procesos plantea que el aprendizaje de asociaciones pavlovianas e instrumentales se encuentran mutuamente relacionadas, quienes inducen un estado motivacional positivo o negativo en los animales que los motiva a realizar la conducta instrumental de evitación (Domjan, Grau et al. 2010). En nuestra tarea el aprendizaje asociativo que motiva a los animales a inhibir activamente su miedo está regulado por la señal apetitiva, que predice la disponibilidad de comida. Esta señal apetitiva compite interactivamente con la señal aversiva que predice la presencia del peligro, resultando en el mayor tiempo que ocupan los animales para acercarse a la recompensa en los ensayos peligrosos.

Gracias al diseño de los entrenamientos conductuales que permiten la adquisición de la respuesta de inhibición activa del miedo, mediante nuestra tarea conductual es posible disociar tres variables clave en la competencia de motivaciones opuestas en un mismo individuo: 1) El impulso motivacional de recompensa, indicado por las latencias cortas de acercamientos a la palanca

(< 20 seg) en ensayos seguros; 2) El impulso motivacional de miedo, indicado por la inmovilización de los animales durante el condicionamiento al miedo; 3) la interacción entre el impulso motivacional del miedo y la recompensa, indicado por las latencias largas de acercamiento a la palanca (>30 seg) en los ensayos peligrosos.

La disociación de estas variables motivacionales, hacen de nuestra tarea conductual un buen modelo para estudiar los posibles mecanismos cerebrales que permiten que los animales resuelvan eficazmente conflictos motivacionales en donde estímulos con valencia emocional se oponen.

5.2 Perspectivas futuras

Los resultados encontrados en esta tesis demuestran que nuestra tarea conductual es un modelo funcional para estudiar cómo los animales eligen acercarse o alejarse de las recompensas cuando existe la experiencia de un peligro inminente. Gracias al diseño conductual de nuestra tarea, es posible diferenciar claramente los mecanismos motivacionales que regulan el comportamiento de inhibición activa del miedo para obtener una recompensa. Sin embargo, aún es necesario que se realicen mejoras en el protocolo conductual para entrenar a los animales y obtener un óptimo funcionamiento de nuestro modelo motivacional de temer o comer. Así mismo, también es necesario que en futuros experimentos se evalúen más variables conductuales y sus posibles efectos sobre la respuesta de inhibición activa del miedo; así como los mecanismos cerebrales que podrían estar regulando este fenómeno.

Uno de los entrenamientos conductuales que requieren de cambios metodológicos, para mejorar su adquisición, es el condicionamiento al miedo. A pesar de que la mayoría de los animales aprendieron a asociar el ruido blanco (EC) con la descarga eléctrica (EI), observamos que el porcentaje de inmovilización (RC) de la mayoría fue siempre menor a lo esperado; muchos respondieron con conductas de escape y mayor movilidad. A lo largo de los experimentos realizados para estandarizar la conducta, tratamos de solucionar este problema de varias maneras. Por ejemplo, alimentamos a los animales antes de iniciar el condicionamiento al miedo para evitar que estuvieran

hambrientos y su movilidad se viera motivada por la búsqueda de comida. Así mismo, redujimos la zona de peligro destinada a este entrenamiento a las medidas estándares de un equipo de condicionamiento al miedo. Mediante la reducción de la zona de entrenamiento, tratamos de evitar que una zona mayor de exploración resultara en la expresión de conductas de escape en los animales durante el condicionamiento al miedo. Sin embargo, ninguno de las opciones evaluadas mejoró significativamente la conducta de inmovilidad de los animales ante el EC.

Una opción más que se podría evaluar, además de los cambios ya optimizados en el condicionamiento al miedo, es modificar el orden en que se realiza este entrenamiento. Es decir, realizar el condicionamiento al miedo antes de que los animales aprendan a cruzar por la comida guiándose por la señal apetitiva. Creemos que esta modificación podría funcionar dado que antes de que se entrene a los animales a cruzar por comida, éstos sólo estarían familiarizados a una zona pequeña del equipo conductual (zona segura) y no a todo el contexto que conforma el equipo de entrenamiento. Lo cual, podría permitir que los animales no estén motivados a desplazarse en busca de comida y por ende respondan de mejor manera al EC; teniendo mayores porcentajes de inmovilización.

La realización del condicionamiento al miedo antes del entrenamiento de cruces seguros puede traer consigo algunas desventajas para los entrenamientos posteriores. Es posible que después de que se le presente un estímulo aversivo a los animales durante el condicionamiento, éstos se desmotiven a cruzar por la comida cuando se les dé la oportunidad en los ensayos de cruces seguros. Quizás, los animales tiendan a generalizar lo aprendido el condicionamiento y esto impida o afecte de alguna manera el desplazamiento de los animales para conseguir comida. Lo cual, en teoría no debería suceder si los animales se condicionan eficazmente a la presencia del EC y no al contexto. La manera en cómo podríamos solucionar el que los animales dejen de cruzar en los ensayos seguros, sería aumentando los días de entrenamiento para este tipo de cruces; hasta lograr que los animales tengan cortas latencias de cruces.

Por otra parte, para conocer más a fondo los mecanismos conductuales que permiten que los animales respondan inhibiendo activamente su miedo para conseguir una recompensa, podemos manipular diferentes variables conductuales y evaluar sus efectos sobre éste fenómeno. Por ejemplo, podemos evaluar cómo altos porcentajes de riesgo afectan la conducta de inhibición activa del miedo durante la discriminación de ensayos.

Durante la estandarización de la tarea conductual fue necesario utilizar sólo el 10 y 30% de probabilidad de presentación de los ensayos peligrosos. Hace falta evaluar qué ocurre en la respuesta de inhibición activa del miedo cuando se incrementa el peligro y cuál es el límite máximo de peligro que un animal puede afrontar activamente inhibiendo su miedo.

Por el entrenamiento de cruces peligrosos, sabemos que utilizar el 100% de riesgo con una intensidad baja de descarga eléctrica es suficiente para evitar que los animales inhiban activamente su miedo y se acerquen a las recompensas, sin embargo, no sabemos si esto pueda volver a ocurrir una vez que los animales ya aprendieron a discriminar. Es posible que el incremento gradual del porcentaje de riesgo en la discriminación no tenga los mismos efectos que en los cruces de ensayos peligrosos. Este nulo efecto se observó con la intensidad de la descarga eléctrica, en donde aumentar la intensidad gradualmente hasta 0.8 mA no provocó efectos sobre la inhibición activa del miedo. Por lo que, es probable que con bajas intensidades de la descarga eléctrica y el incremento gradual del porcentaje de riesgo, los animales sólo incrementen el tiempo de latencias de cruces en ensayos peligrosos; pero que, sigan inhibiendo activamente su miedo con un porcentaje del 100% del peligro.

Otra variable que podemos evaluar, en la respuesta de inhibición activa del miedo, es el incremento del valor motivacional del impulso apetitivo por la recompensa. La manera en cómo podríamos aumentar el impulso apetitivo de los animales es mediante el incremento la magnitud de los reforzadores, que podría ser evaluada de manera diferencial en condiciones seguras y peligrosas durante la discriminación.

Por ejemplo, una vez que los animales ya aprendieron a discriminar, podríamos programar al equipo para que en los ensayos peligrosos se entreguen 4 reforzadores y en los seguros sólo 1 reforzador; es decir una relación de 1 a 4. Con lo cual, probablemente observaríamos un decremento en las latencias de cruces en ensayos peligrosos y ningún efecto en los ensayos seguros. Por su parte, si la razón de 1 a 4 de los reforzadores se diera de manera inversa, es decir que fueran 4 reforzadores para los ensayos seguros y sólo 1 reforzador para los peligrosos, probablemente las ratas dejarían de cruzar la mayoría de las veces en los ensayos peligrosos y cruzarían mucho más rápido en los ensayos seguros. Esto debido a que ya no resultaría ventajoso inhibir activamente el miedo por una recompensa más pequeña de lo que se podría obtener en condiciones seguras.

El poder jugar con la magnitud de las recompensas en nuestra tarea de inhibición activa del miedo, nos permitiría estudiar también como los animales eligen entre opciones ventajosas y desventajosas. Así como entender cómo los animales igualan sus respuestas ante las opciones del ambiente que más les convienen, lo cual, actualmente se utiliza en las tareas conductuales de costo beneficio.

En las tareas de costo beneficio la magnitud de los reforzadores está en función de la elección de los animales por opciones más ventajosas que otras. Generalmente, las opciones ventajosas están acompañadas de un "costo" que involucra la demora en la entrega de los reforzadores o la realización de un esfuerzo físico (como subir una rampa). Recientemente un estudio propuso la entrega de una descarga eléctrica, en diferentes probabilidades, como un riesgo para conseguir la recompensa ventajosa (Holec, Pirot et al. 2014, Orsini, Trotta et al. 2015).

Las tareas de costo beneficio son un buen modelo para estudiar la toma de decisiones basadas en un riesgo, sin embargo, en la mayoría de estas tareas el riesgo utilizado involucra una alta gama de probabilidades de que aparezca o no un riesgo; nunca se ha evaluado cómo los animales eligen una opción ventajosa cuando el peligro siempre está presente. Por lo que, nuestra tarea

conductual también podría ser un buen modelo para estudiar como los animales eligen entre opciones ventajosas y desventajosas que involucran un peligro inminente.

De modo que, una de las grandes ventajas que tiene la implementación de nuestra tarea conductual es que con pequeñas modificaciones en los parámetros de presentación de los estímulos es posible estudiar diferentes conductas motivacionales y sus mecanismos conductuales y cerebrales. Los cuales, se han tratado de estudiar mediante el empleo de diversas tareas conductuales que involucran diferentes estímulos motivacionales. El hecho de que estas conductas motivacionales puedan estudiarse en un mismo conflicto motivacional, como el de temer o comer, podría ayudarnos a reducir la enorme variabilidad que actualmente existe sobre los mecanismos que las regulan. Por lo que, es necesario que en futuros experimentos se contemple la posibilidad de estudiar otras conductas motivacionales además de la conducta de inhibición activa del miedo en busca de recompensas; para evaluar los alcances limitaciones de nuestro modelo conductual.

5.2.1 Mecanismos cerebrales de la inhibición activa del miedo en busca de recompensas

Como se mencionó en los antecedentes de esta tesis, la expresión del miedo no siempre es adaptativa. En ocasiones el miedo puede expresarse de manera exagerada y en condiciones en donde ya no es necesaria su expresión, propiciando la generación de trastornos conductuales como la ansiedad que se caracteriza por la irracionalidad de miedos excesivos.

Una de las técnicas más utilizadas para tratar el miedo exagerado es la terapia de exposición. Esta terapia se basa en los principios conductuales de la extinción para lograr que los pacientes inhiban sus miedos irracionales (Rothbaum and Davis 2003). Sin embargo, al igual que en la extinción, la inhibición del miedo exagerado mediante las terapias de exposición suele ser un proceso lento y temporal. A menudo se requieren de varias sesiones de terapia para lograr avances significativos en la reducción de las respuestas del miedo exagerado. Las cuales, una vez inhibidas, suelen recuperarse después de un tiempo de haber concluido el tratamiento. (Rothbaum and Davis 2003,

Lissek and van Meurs 2014). Así mismo, las terapias de exposición suelen ser poco efectivas dado sus altas tasas de deserción de los pacientes (Rothbaum and Davis 2003). La mayoría de los pacientes interrumpen sus tratamientos dado que no logran superar sus miedos en las primeras sesiones de la terapia, provocando un impedimento de la extinción y que el miedo exagerado continúe expresándose. Por lo que, actualmente existen enormes esfuerzos por mejorar los tratamientos del miedo exagerado

Una manera en que se podrían mejorar los efectos de la terapia de exposición, sería que los pacientes aprendieran a inhibir activamente su miedo desde el inicio de la terapia. La inhibición activa del miedo, podría permitir que los efectos de la extinción actúen y el miedo exagerado pueda inhibirse de manera inmediata y permanentemente. Por lo que, entender que mecanismos cerebrales permiten que los animales inhiban activamente su miedo a una experiencia peligrosa nos permitiría mejorar los tratamientos conductuales con los que actualmente se tratan los desórdenes emocionales del miedo exagerado.

Pero, ¿Qué mecanismos cerebrales son necesarios para que los animales inhiban activamente su miedo a fin de conseguir una recompensa? Debido a que nuestra tarea conductual de temer o comer se ven involucrados los mecanismos conductuales del condicionamiento al miedo y el condicionamiento instrumental apetitivo, es posible que los circuitos cerebrales que regulan ambos mecanismos conductuales estén participando a la hora de inhibir activamente el miedo por una recompensa.

Como se mencionó anteriormente, el circuito cerebral que permite la expresión del miedo condicionado está regulado principalmente por la actividad que la amígdala rige sobre la GPA y por su comunicación recíproca con la CPF (ver figura 1.2). Mientras que, el circuito cerebral que permite que un animal se acerque a una recompensa está mediado por la actividad dopaminérgica que el NAcc y la CPF reciben del ATV (ver figura 1.8). De manera independiente, ambos circuitos cerebrales han sido ampliamente estudiados y su conexión anatómica se conoce bastante bien. Sin embargo, se

desconoce mediante qué mecanismos o estructuras cerebrales ambos circuitos pueden comunicarse interactivamente para regular la conducta emocional de los animales cuando están frente a un conflicto motivacional.

Debido al importante papel que tiene la CPF sobre los mecanismos cerebrales del miedo y la búsqueda de recompensas, es probable que la interacción entre ambos circuitos cerebrales esté regulada por esta corteza cerebral. La CPF se encuentra ubicada dentro del lóbulo frontal del cerebro, y se ha descrito como un área cerebral importante para la regulación de la conducta emocional (Sotres-Bayon, Cain et al. 2006, Carlson 2014).

El caso clínico más famoso que demostró por primera vez la participación de la CPF en la regulación emocional es el de Phineas Gage, quien sobrevivió a un terrible accidente en donde una barra de hierro impactó contra su rostro. La barra penetró la mejilla izquierda de Gage y salió por la parte superior de su cabeza, destruyendo la parte del lóbulo frontal de su cerebro. Los reportes del médico que atendió a Gage, durante su accidente y recuperación, indicaron que después del accidente presentó serios cambios conductuales; mostrándose como un hombre inquieto, impulsivo y desconsiderado con los demás (Sotres-Bayon, Cain et al. 2006, García-Molina 2012). Después de los reportes del accidente de Gage y sus terribles consecuencias, muchos investigadores comenzaron a estudiar el papel del lóbulo frontal en diversos modelos animales. Uno de esos estudios fue realizado por Jacobsen y colaboradores, quienes entrenaban a chimpancés a recordar la localización de estímulos apetitivos (comida) después de una breve presentación de éstos. Los investigadores observaron que un animal en particular mostraba reacciones emocionales violentas al cometer errores en la localización de la comida. Estas reacciones desaparecieron luego de la extirpación de la mayor parte del lóbulo frontal. De modo que, a diferencia de lo encontrado en el caso de Gage, la extirpación del lóbulo frontal provocó un debilitamiento de la reactividad emocional de los animales (Carlson 2014).

A partir de estos descubrimientos, el estudio de la participación de la CPF en la regulación conductual aumentó drásticamente. Algunos de estos estudios

encontraron efectos diferenciados en la regulación emocional en regiones específicas de la CPF. La CPF, del cerebro de las ratas, se encuentra dividida en dos zonas principales: la CPFm, en donde se encuentra la región PL e IL, y Corteza Orbitofrontal (COF). Básicamente, se ha reportado que los daños en la COF altera la flexibilidad cognitiva de los animales para adecuarse a los cambios en las contingencias del ambiente. Mientras que, la CPFm se ha visto más relacionada con el ajuste del comportamiento a partir de las señales emocionales o motivacionales del ambiente (Sotres-Bayon, Cain et al. 2006). Ambas cortezas, CPFm y COF, se encuentran anatómicamente y funcionalmente relacionadas con las principales estructuras cerebrales que median el miedo (amígdala) y la búsqueda de recompensas (NAcc). Diversos estudios experimentales que han evaluado las proyecciones de la CPF han descubierto que esta región tanto en su área medial y orbitofrontal, se conecta recíprocamente con la amígdala y el NAcc (Moorman, James et al. 2014).

Funcionalmente, se ha encontrado que la Corteza PL participa activamente en la expresión del miedo y la búsqueda de recompensas. En estudios en donde se ha estimulado eléctricamente la actividad de la PL en animales condicionados, se ha encontrado un aumento significativo en el porcentaje de inmovilización durante la presentación de un tono condicionado (Vidal-Gonzalez, Vidal-Gonzalez et al. 2006). Mientras que, en estudios en donde han entrenado a animales a presionar una palanca para conseguir una droga como recompensa, encontraron que la infusión local de dopamina en la Corteza PL incrementa la respuesta instrumental de palanqueo para conseguirla (Peters, Kalivas et al. 2009, Moorman, James et al. 2014). Por su parte, la actividad de la corteza IL se ha relacionado con la inhibición pasiva del miedo (Sierra-Mercado, Padilla-Coreano et al. 2011) y con la búsqueda de recompensas (Peters, Kalivas et al. 2009). Se ha reportado que en animales condicionados la estimulación eléctrica de la IL inhibe la expresión del miedo a un tono condicionado. Mientras que, la infusión de drogas que estimulan la actividad de la IL disminuyen la presión de una palanca en animales que fueron entrenados a presionarla para recibir una droga (Peters, Kalivas et al. 2009, Moorman, James et al. 2014). Los hallazgos descritos anteriormente sobre la

relación funcional de la corteza PL e IL sobre la conducta del miedo y la búsqueda de recompensas, sugieren un papel primordial de la CPF sobre la regulación de la amígdala para permitir la expresión del miedo condicionado y sobre el NAcc para permitir el desencadenamiento de respuestas de acercamiento a estímulos apetitivos.

En cuanto a la COF, estudios recientes han reportado que las neuronas de ésta corteza responden tanto a estímulos apetitivos como a aversivos (Barberini, Morrison et al. 2012). En un estudio se presentaron a monos Rhesus dos ECs, uno de ellos fue asociado con un estímulo aversivo (soplo de aire) y el otro con una recompensa (agua); después de un tiempo ambos estímulos fueron revertidos contingentemente. El EC que predijo el estímulo aversivo se emparejó con la recompensa, mientras que, el EC que predijo inicialmente la recompensa predijo ahora el estímulo aversivo. Para ambas condiciones se realizaron registros electrofisiológicos de la actividad neuronal en la COF, en donde, se encontraron dos poblaciones diferentes de neuronas que respondieron más por los estímulos aversivos (neuronas negativas) o por los estímulos apetitivos (neuronas positivas). En ambos tipos de neuronas, positivas o negativas, en su actividad eléctrica se vio reflejado la reversión de contingencias para ambos estímulos. Esto, demuestra que las neuronas de la COF responden a estímulos ambientales que predicen resultados gratificantes y aversivos.

En conjunto, los resultados obtenidos en ambas regiones de la CPF (CPFm y COF) sugieren que esta corteza cerebral está preparada para modular la interacción de los estímulos del miedo y la recompensa. De modo que, es posible que la actividad de la CPF controle la interacción entre el circuito del miedo basado en la amígdala (impulso de temer) y el circuito de recompensas basado en el NAcc (impulso de comer) para regular la conducta emocional frente a un conflicto motivacional como el de temer o comer. En donde, la CPF permita la inhibición de las respuestas de miedo, a través del circuito del miedo, para iniciar el acercamiento apetitivo a través de una excitación del circuito de recompensas (Figura 5.1).

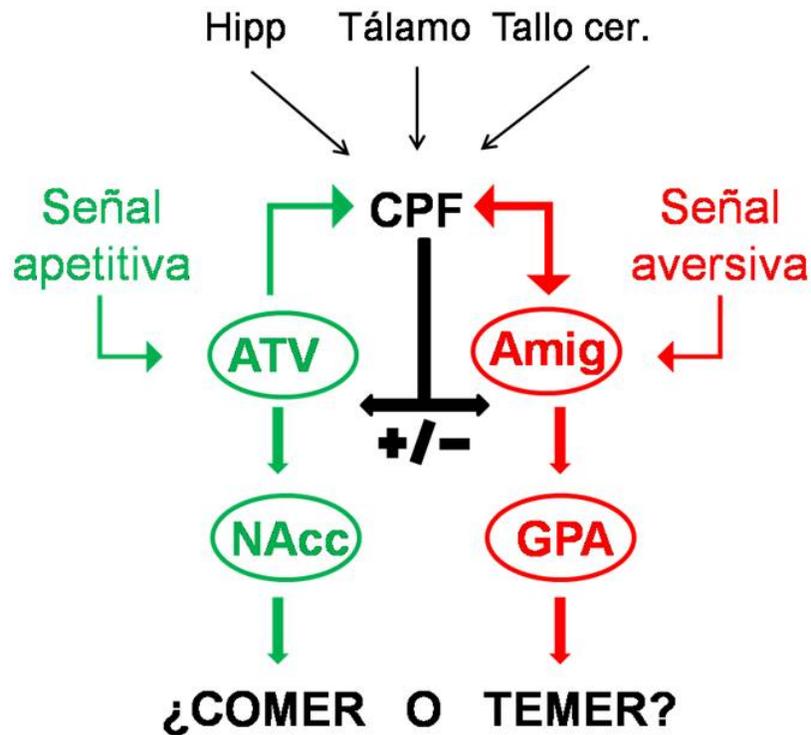


Figura 5.1. Modelo hipotético de interacción de los circuitos cerebrales del miedo y la recompensa. En el conflicto motivacional de temer o comer, es posible que la actividad de la CPF inhiba al circuito del miedo, que procesa información de la señal aversiva, y excite el circuito de recompensas, que procesa la información de la señal apetitiva, para permitir el acercamiento de los animales hacia las recompensas cuando hay un peligro inminente.

Estudiar los mecanismos cerebrales que subyacen a la conducta de inhibición activa del miedo en busca de recompensas nos permitirá conocer cómo los circuitos cerebrales que procesan información referente a estímulos aversivos y apetitivos interactúan para regular la conducta emocional, sobre todo cuando existe un conflicto de motivaciones opuestas.

REFERENCIAS

- Barberini, C. L., S. E. Morrison, A. Saez, B. Lau and C. D. Salzman (2012). "Complexity and competition in appetitive and aversive neural circuits." *Frontiers in Neuroscience* 6.
- Blair, H. T., F. Sotres-Bayon, M. A. Moita and J. E. Ledoux (2005). "The lateral amygdala processes the value of conditioned and unconditioned aversive stimuli." *Neuroscience* 133(2): 561-569.
- Blanchard, D. C. and R. J. Blanchard (1972). "Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions." *Journal of comparative and physiological psychology* 81(2): 281-290.
- Bouton, M. E. (2004). "Context and behavioral processes in extinction." *Learning & memory* 11(5): 485-494.
- Bravo-Rivera, C., C. Roman-Ortiz, E. Brignoni-Perez, F. Sotres-Bayon and G. J. Quirk (2014). "Neural structures mediating expression and extinction of platform-mediated avoidance." *The Journal of Neuroscience* 34(29): 9736-9742.
- Cain, C. K. and J. E. LeDoux (2007). "Escape from fear: a detailed behavioral analysis of two atypical responses reinforced by CS termination." *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 33(4): 451-463.
- Cardinal, R. N., J. A. Parkinson, J. Hall and B. J. Everitt (2002). "Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 26(3): 321-352.
- Carlson, N. R. (2014). *Fisiología de la conducta*. Madrid etc., Pearson Educación.
- Chance, P. (2003). *Learning & behavior*. Australia ; Belmont, CA, Thomson/Wadsworth.
- Domjan, M., J. W. Grau and M. A. Krause (2010). *The principles of learning and behavior*. Australia ; Belmont, CA, Wadsworth Cengage Learning.
- Feldman, R. S. (1992). *Elements of psychology*. New York, McGraw-Hill.
- Fernando, A. B., G. P. Urcelay, A. C. Mar, T. A. Dickinson and T. W. Robbins (2014). "The role of the nucleus accumbens shell in the

mediation of the reinforcing properties of a safety signal in free-operant avoidance: dopamine-dependent inhibitory effects of d-amphetamine." *Neuropsychopharmacology* 39(6): 1420-1430.

- Fields, H. L., G. O. Hjelmstad, E. B. Margolis and S. M. Nicola (2007). "Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement." *Annual Review of Neuroscience* 30: 289-316.
- Fonberg, E. (1965). "Effect of partial destruction of the amygdaloid complex on the emotional-defensive behaviour of dogs." *Bulletin de l'Académie polonaise des sciences. Série des sciences biologiques* 13(7): 429.
- García-Molina, A. (2012). "Phineas Gage and the enigma of the prefrontal cortex." *Neurología (English Edition)* 27(6): 370-375.
- Hartley, C. A. and E. A. Phelps (2010). "Changing fear: the neurocircuitry of emotion regulation." *Neuropsychopharmacology* 35(1): 136-146.
- Helmstetter, F. J. and P. S. Bellgowan (1994). "Effects of muscimol applied to the basolateral amygdala on acquisition and expression of contextual fear conditioning in rats." *Behavioral neuroscience* 108(5): 1005-1009.
- Herrnstein, R. J. and P. N. Hineline (1966). "Negative reinforcement as shock-frequency reduction." *Journal of the experimental analysis of behavior* 9(4): 421-430.
- Holec, V., H. L. Pirot and D. R. Euston (2014). "Not all effort is equal: the role of the anterior cingulate cortex in different forms of effort-reward decisions." *Frontiers in behavioral neuroscience* 8: 12.
- Iversen, I. H. and K. A. Lattal (1991). *Experimental Analysis of Behavior*, Elsevier.
- Jenkins, H. M. and R. H. Harrison (1960). "Effect of discrimination training on auditory generalization." *Journal of Experimental Psychology* 59: 246-253.
- Johansen, J. P., C. K. Cain, L. E. Ostroff and J. E. LeDoux (2011). "Molecular mechanisms of fear learning and memory." *Cell* 147(3): 509-524.

- Kalivas, P. W. and M. Nakamura (1999). "Neural systems for behavioral activation and reward." *Current opinion in neurobiology* 9(2): 223-227.
- Kim, J. J. and M. W. Jung (2006). "Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 30(2): 188-202.
- Kim, J. J., R. A. Rison and M. S. Fanselow (1993). "Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear." *Behav Neurosci* 107(6): 1093-1098.
- King, F. A. (1958). "Effects of septal and amygdaloid lesions on emotional behavior and conditioned avoidance responses in the rat." *The Journal of nervous and mental disease* 126(1): 57-63.
- Klüver, H. and P. C. Bucy (1937). "'Psychic blindness" and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in Rhesus monkeys." *American Journal of Physiology*.
- Lazaro-Munoz, G., J. E. LeDoux and C. K. Cain (2010). "Sidman instrumental avoidance initially depends on lateral and basal amygdala and is constrained by central amygdala-mediated Pavlovian processes." *Biological psychiatry* 67(12): 1120-1127.
- LeDoux, J. E. (2000). "Emotion circuits in the brain." *Annual Review of Neuroscience* 23: 155-184.
- LeDoux, J. E. (2012). "Evolution of human emotion: a view through fear." *Progress in brain research* 195: 431-442.
- Levin, E. D. and J. J. Buccafusco (2006). *Animal models of cognitive impairment*. Boca Raton, CRC/Taylor & Francis.
- Lissek, S. and B. van Meurs (2014). "Learning models of PTSD: Theoretical accounts and psychobiological evidence." *International journal of psychophysiology*.
- Mackintosh, N. J. (1994). *Animal learning and cognition*. San Diego, Academic Press.
- Marek, R., C. Strobel, T. W. Bredy and P. Sah (2013). "The amygdala and medial prefrontal cortex: partners in the fear circuit." *The Journal of physiology* 591(Pt 10): 2381-2391.

- Maren, S. and G. J. Quirk (2004). "Neuronal signalling of fear memory." *Nature Reviews Neuroscience* 5(11): 844-852.
- Maren, S., S. A. Yap and K. A. Goosens (2001). "The amygdala is essential for the development of neuronal plasticity in the medial geniculate nucleus during auditory fear conditioning in rats." *The Journal of Neuroscience* 21(6): RC135.
- Mazur, J. E. (2006). Learning and behavior. Upper Saddle River, N.J., Pearson/Prentice Hall.
- Mirenowicz, J. and W. Schultz (1994). "Importance of unpredictability for reward responses in primate dopamine neurons." *Journal of neurophysiology* 72(2): 1024-1027.
- Mogenson, G. J., D. L. Jones and C. Y. Yim (1980). "From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system." *Progress in neurobiology* 14(2-3): 69-97.
- Moorman, D. E., M. H. James, E. M. McGlinchey and G. Aston-Jones (2014). "Differential roles of medial prefrontal subregions in the regulation of drug seeking." *Brain research*.
- Moscarello, J. M. and J. E. LeDoux (2013). "Active avoidance learning requires prefrontal suppression of amygdala-mediated defensive reactions." *The Journal of Neuroscience* 33(9): 3815-3823.
- Muller, J., K. P. Corodimas, Z. Fridel and J. E. LeDoux (1997). "Functional inactivation of the lateral and basal nuclei of the amygdala by muscimol infusion prevents fear conditioning to an explicit conditioned stimulus and to contextual stimuli." *Behavioral neuroscience* 111(4): 683-691.
- Nili, U., H. Goldberg, A. Weizman and Y. Dudai (2010). "Fear thou not: activity of frontal and temporal circuits in moments of real-life courage." *Neuron* 66(6): 949-962.
- Olds, J. and P. Milner (1954). "Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain." *Journal of comparative and physiological psychology* 47(6): 419-427.

- Orsini, C. A. and S. Maren (2012). "Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 36(7): 1773-1802.
- Orsini, C. A., R. T. Trotta, J. L. Bizon and B. Setlow (2015). "Dissociable roles for the basolateral amygdala and orbitofrontal cortex in decision-making under risk of punishment." *The Journal of Neuroscience* 35(4): 1368-1379.
- Pape, H. C. and D. Pare (2010). "Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear." *Physiological reviews* 90(2): 419-463.
- Parkinson, J. A., R. N. Cardinal and B. J. Everitt (2000). "Limbic cortical-ventral striatal systems underlying appetitive conditioning." *Progress in Brain Research* 126: 263-285.
- Pavlov, I. P. and G. V. Anrep (1927). *Conditioned reflexes; an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. London, Oxford University Press: Humphrey Milford.
- Pearce, J. M. (1997). *Animal Learning and Cognition: An Introduction*, Psychology Press.
- Peña, D. F., N. D. Engineer and C. K. McIntyre (2013). "Rapid remission of conditioned fear expression with extinction training paired with vagus nerve stimulation." *Biological psychiatry* 73(11): 1071-1077.
- Peters, J., P. W. Kalivas and G. J. Quirk (2009). "Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex." *Learning & memory* 16(5): 279-288.
- Quirk, G. J. and D. Mueller (2008). "Neural mechanisms of extinction learning and retrieval." *Neuropsychopharmacology* 33(1): 56-72.
- Quirk, G. J., G. K. Russo, J. L. Barron and K. Lebron (2000). "The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished fear." *The Journal of Neuroscience* 20(16): 6225-6231.
- Ramirez, F., J. M. Moscarello, J. E. LeDoux and R. M. Sears (2015). "Active avoidance requires a serial basal amygdala to nucleus accumbens shell circuit." *The Journal of Neuroscience* 35(8): 3470-3477.

- Rescorla, R. A. (1968). "Probability of shock in the presence and absence of CS in fear conditioning." *Journal of comparative and physiological psychology* 66(1): 1.
- Rothbaum, B. O. and M. Davis (2003). "Applying learning principles to the treatment of post-trauma reactions." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1008: 112-121.
- Servatius, R. J. and T. J. Shors (1994). "Exposure to inescapable stress persistently facilitates associative and nonassociative learning in rats." *Behavioral neuroscience* 108(6): 1101-1106.
- Sierra-Mercado, D., N. Padilla-Coreano and G. J. Quirk (2011). "Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear." *Neuropsychopharmacology* 36(2): 529-538.
- Silverman, A. P. (1978). *Animal behaviour in the laboratory : behavioural tests and their interpretation illustrated mainly by psychopharmacology in the rat.* London, Chapman and Hall.
- Solomon, R. L., L. J. Kamin and L. C. Wynne (1953). "Traumatic avoidance learning: the outcomes of several extinction procedures with dogs." *The Journal of Abnormal and Social Psychology* 48(2): 291-302.
- Sotres-Bayon, F., D. E. Bush and J. E. LeDoux (2004). "Emotional perseveration: an update on prefrontal-amygdala interactions in fear extinction." *Learning & Memory* 11(5): 525-535.
- Sotres-Bayon, F., C. K. Cain and J. E. LeDoux (2006). "Brain mechanisms of fear extinction: historical perspectives on the contribution of prefrontal cortex." *Biological psychiatry* 60(4): 329-336.
- Sotres-Bayon, F. and G. J. Quirk (2010). "Prefrontal control of fear: more than just extinction." *Current opinion in neurobiology* 20(2): 231-235.
- Steimer, T. (2002). "The biology of fear- and anxiety-related behaviors." *Dialogues in clinical neuroscience* 4(3): 231-249.
- Tarpay, R. M. and L. E. Bourne (1982). *Principles of animal learning and motivation.* Glenview, Ill., Scott, Foresman.
- Vidal-Gonzalez, I., B. Vidal-Gonzalez, S. L. Rauch and G. J. Quirk (2006). "Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and

infralimbic cortex on the expression of conditioned fear." *Learning & memory* 13(6): 728-733.

- Weiskrantz, L. (1956). "Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys." *Journal of comparative and physiological psychology* 49(4): 381-391.
- Wendler, E., J. C. Gaspar, T. L. Ferreira, J. K. Barbiero, R. Andreatini, M. A. Vital, C. D. Blaha, P. Winn and C. Da Cunha (2014). "The roles of the nucleus accumbens core, dorsomedial striatum, and dorsolateral striatum in learning: performance and extinction of Pavlovian fear-conditioned responses and instrumental avoidance responses." *Neurobiology of learning and memory* 109: 27-36.
- Young, S. L. and M. S. Fanselow (1992). "Associative regulation of Pavlovian fear conditioning: Unconditioned stimulus intensity, incentive shifts, and latent inhibition." *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 18(4): 400.