



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**La ablación de la neurogénesis hipocampal después de la
extinción promueve el regreso del miedo**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

Sofía Grecia López Oropeza



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Francisco Xavier Sotres Bayón
2017**

Ciudad Universitaria, CDMX



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.

A mi madre, abuelos y hermano. Por todo el amor que me han dado.

Agradecimientos

A mi tutor el Dr. Francisco Sotres Bayón, por todo su apoyo a lo largo de este proyecto. Por impulsar mis inquietudes científicas. Por permitirme expresar mi opinión libremente. Por enriquecer mi perspectiva acerca de los experimentos. Por enseñarme disciplina y constancia. Gracias por darme las bases necesarias para continuar por esta senda científica.

Al Dr. Alonso Martínez Canabal, por ser mi guía en todo momento. Por la paciencia con la que me transmitiste tus conocimientos. Por corregirme cuando era necesario y felicitarme si así lo ameritaba. Por impulsarme a cuestionar y no hacer nada sin preguntar el “por qué” de las cosas. Gracias por todo lo que me has enseñado.

A mis sinodales, por sus comentarios y sugerencias, que hicieron que este trabajo fuera mejor. Gracias al Dr. Gabriel Gutiérrez, a la Dra. Patricia Rivas y Dra. Diana Escalante. A la Dra. Paola Ballesteros que me apoyo en todo momento con el protocolo de irradiación.

A la Dra. Leticia Ramirez Lugo por su apoyo técnico dentro del laboratorio.

A mi madre, por enseñarme a ser una persona dedicada y constante. Por alentarme a buscar lo que me gusta y luchar por conseguirlo. Por regañarme cuando estoy haciendo algo mal y ayudarme a regresar a mi camino. Pero sobretodo, por todo tu amor y apoyo durante cada momento de mi vida.

A mi hermano, porque sin tu presencia jamás me hubieran llegado tantas buenas ocurrencias en mi vida. Por recordarme a ser humilde y paciente. Por todas las

conversaciones sarcásticas de fin de semana después de una larga semana de trabajo. Gracias por todo tu apoyo y amor.

A mis abuelos, porque cada relato suyo me recordaba lo corta y efímera que es la vida. Por enseñarme a disfrutar cada momento. Por todas esas tardes de café y las comidas a prisa, para finalizar un día cansado. Gracias por alimentar mi alma con todos esos besos y abrazos de amor.

A mi familia. A los López, por todas sus pláticas satíricas sobre temas sociales que nunca he entendido pero, que me ayudaban a tener un pensamiento crítico. A los Oropeza, porque me recordaban que la vida también se trata de jugar sin perder la madurez. A todos, por su apoyo, comprensión y amor.

A Marco por todo su apoyo y amor, que hicieron que el último año en el laboratorio fuera más ameno. Porque me hiciste olvidar el ajetreo de la vida por unos instantes y porque siempre me recordabas que hay que trabajar duro por lo que se quiere lograr.

A mis amigos del laboratorio, porque hicieron de mi primera experiencia científica, una amena y enriquecedora. A Ana, Ale y Gerónimo, por todas esas tertulias en las que me transmitieron un poco de sus conocimientos. Gracias Ana por platicar infinitamente a pesar de tener mucho trabajo. Gracias Ale por darme dulces y ayudarme a entender mis artículos. Gracias Gerónimo por ayudarme con mi manada de ratas.

A Abril, por ser mi amiga y mi compañera durante todo este proyecto. Gracias por tu cariño, abrazos y palabras.

Contenido

Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	vi
1. Lista de abreviaturas.....	ix
2. Tabla de figuras.....	x
3. Resumen.....	24
4. Introducción.....	27
4.1. Miedo.....	27
4.1.1. ¿Qué es el miedo?.....	27
4.1.2. Condicionamiento al miedo.....	28
4.1.3. Circuito neuronal del miedo.....	29
4.2. Extinción.....	41
4.2.1. ¿Qué es la extinción?.....	41
4.2.2. Circuito neuronal de la extinción del miedo.....	42
4.3. Regreso del miedo: miedo vs inhibición del miedo.....	47
4.3.1. ¿Qué es el regreso del miedo?.....	47
4.3.2. La neurogénesis hipocampal y su papel en la memoria de miedo.....	49
5. Planteamiento del problema.....	51
6. Pregunta de investigación.....	52
7. Hipótesis.....	52

8.	Objetivo	52
	Objetivo General.....	52
	Objetivos Particulares.....	52
9.	Método	53
9.1.	Animales y aparatos.....	53
9.1.1.	Animales	53
9.1.2.	Equipo conductual.....	53
9.2.	Manipulación de la neurogénesis	54
9.2.1.	Irradiación	54
9.2.2.	Enriquecimiento ambiental.....	56
9.3.	Protocolo conductual.....	56
9.3.1.	Entrenamiento de palanqueo.....	56
9.3.2.	Condicionamiento al miedo.....	59
9.3.3.	Extinción y pruebas	60
9.4.	Experimentos	61
9.4.1.	Experimento Post-Extinción.....	61
9.4.2.	Experimento Pre-Extinción.....	63
9.4.3.	Experimento No-Extinción.....	64
9.10.	Inmunohistoquímica	65
9.10.1.	Perfusión y preparación del cerebro.....	65
9.10.2.	Preparación de las secciones.....	66
9.10.3.	Inmunohistoquímica	66
9.10.4.	Contratinción	69
9.10.5.	Análisis de datos.....	69
10.	Resultados.....	72
10.1.	La ablación de la neurogénesis después de la extinción incrementa el regreso del miedo modificando circuitos hipocampales, corticales y de la habénula lateral.	72
10.1.1.	La IRR después de la extinción incrementa el regreso del miedo.	72
10.1.2.	Evaluación de la neurogénesis y actividad neural en el circuito de miedo.	75
10.2.	La ablación de la neurogénesis <i>antes</i> de la extinción no tiene efecto sobre el regreso del miedo.....	81
10.2.1.	La IRR previa a la extinción no altera el regreso del miedo.	81

10.2.2.	La ablación de la neurogénesis no se relaciona con la expresión del miedo.	84
10.3.	La ablación de la neurogénesis no afecta los niveles de miedo.....	85
10.3.1.	La IRR en ausencia de extinción no afecta los niveles de miedo.	85
10.3.2.	La ablación de la neurogénesis en ausencia de extinción, no correlaciona con la conducta.....	87
10.4.	La ablación de neurogénesis en animales con neurogénesis incrementada, promueve el regreso del miedo.....	88
10.4.1.	La IRR en animales enriquecidos afecta el regreso del miedo.....	88
10.4.2.	El aumento en el regreso del miedo es dependiente de la ablación de la neurogénesis.....	90
11.	Discusión	93
11.1.	Irradiación como método eficaz de ablación de la neurogénesis.	94
11.2.	La ablación de la neurogénesis después de la extinción incrementa el regreso del miedo, reclutando actividad de circuitos hipocampales, corticales y de la habénula. 94	
11.3.	La ablación de la neurogénesis antes de la extinción no.....	99
11.4.	La ablación de la neurogénesis en ausencia de extinción no afecta los niveles de miedo.	99
11.5.	La ablación de neurogénesis en animales con neurogénesis incrementada, promueve el regreso del miedo.....	100
12.	Conclusión	102

1. Lista de abreviaturas

ABA	Amígdala basal
ACE	Amígdala central
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CAv	<i>Cornu ammonis ventral</i>
CND	Condicionamiento
CPFm	Corteza medial prefrontal
DCX	Doblecortina
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
EXT	Extinción
GD	Giro dentado
Hbl	Habénula lateral
IL	Corteza infralímbica
IRR	IRR
IV	Intervalo variable
MAM	Acetato de metilazoxymetanol
NIT	Núcleo intralaminar del tálamo
NPV	Núcleo paraventricular del hipotálamo
PB	Peso blanco
PBA	Prueba
PBS	Buffer de fosfatos salino
PI	Peso inicial
PL	Corteza prelímbica
RF	Razón fija
SGP	Sustancia gris periacueductal
SUBv	Subículo ventral
TBS-T	Buffer de Tris salino con Tween

2. Tabla de figuras

Figura 1 Circuito de expresión del miedo	30
Figura 2 Estructura del hipocampo.....	34
Figura 3 Conectividad dentro del hipocampo	35
Figura 4 Neurogénesis	36
Figura 5 Circuito de inhibición del miedo.....	43
Figura 6 Circuito de miedo VS no miedo	48
Figura 19 Acelerador lineal para IRR X.....	55
Figura 20 Ambiente enriquecido.....	56
Figura 21 Caja operante con contexto de palanqueo.....	57
Figura 22 Caja operante con contexto de condicionamiento.....	60
Figura 23 Protocolo Post-Extinción IrIRR.....	62
Figura 24 Protocolo Post-Extinción IRR-Enriquecimiento	63
Figura 25 Protocolo Pre-Extinción.....	64
Figura 26 Experimento No-Extinción.....	64
Figura 27 Medias ponderadas para cuantificar c-Fos y DCX.....	70
Figura 18 Disminuir la neurogénesis después de la extinción, tiene un efecto en la conducta.....	76
Figura 19 Disminuir la neurogénesis después de la extinción, disminuye la actividad en CA3	77
Figura 20 Disminuir la neurogénesis después de la extinción, disminuye la actividad de la IL	78
Figura 21 Disminuir la neurogénesis después de la extinción, no tiene efecto en la Amígdala	79
Figura 22 Disminuir la neurogénesis aumenta la actividad de la Hbl	80
Figura 23 Normalización de los datos de c-Fos	81
Figura 25 La IRR X antes de la extinción disminuye la neurogénesis, sin efecto en la conducta	84
Figura 26 Si no existe extinción, la IRR X no incrementa el regreso del miedo ...	86
Figura 27 Disminuir la neurogénesis cuando no hay extinción, no afecta la conducta.....	87
Figura 28 El enriquecimiento ambiental no revierte los efectos de la IRR X	90
Figura 29 El aumento del regreso del miedo es dependiente de la ablación de la neurogénesis.....	91

3. Resumen

La formación de una memoria de miedo a un contexto es resultado de asociar un contexto a un evento aversivo (memoria de condicionamiento). A través de la exposición repetida al mismo contexto en ausencia del evento aversivo, se forma una memoria de inhibición del miedo (memoria de extinción). Sin embargo, esta extinción del miedo es temporal y con el paso del tiempo el miedo regresa (regreso del miedo). Las memorias de miedo condicionado dependen de la actividad de un circuito compuesto principalmente por la amígdala, la corteza prefrontal, y recientemente se ha involucrado a la habénula. Como la expresión de la memoria de condicionamiento y de extinción depende del contexto donde ocurren, la regulación del miedo depende fuertemente del hipocampo, estructura que codifica el contexto. Una particularidad del hipocampo es que genera nuevas neuronas (neurogénesis) en la vida adulta. Recientemente se reportó que la neurogénesis hipocampal modifica memorias preexistentes, pero no es claro que función tenga esta modificación en la conducta de miedo. En este trabajo, investigamos si la neurogénesis hipocampal es necesaria para el regreso del miedo. Hipotetizamos que la ablación de la neurogénesis altera el regreso del miedo al modificar la memoria preexistente de extinción.

Para probar esta hipótesis, ratas previamente entrenadas a presionar una barra para obtener comida, fueron condicionadas al contexto, recibieron entrenamiento de extinción y una prueba de expresión del miedo, todo en el mismo contexto. Para probar si la neurogénesis es necesaria para el regreso del miedo, la bloqueamos utilizando tres sesiones de irradiación focal de rayos X (IRR). Estas

sesiones de IRR ocurrieron antes, después o en ausencia del entrenamiento de extinción. Un mes después del bloqueo de neurogénesis, las ratas recibieron una prueba de evocación para evaluar el regreso del miedo. Finalmente, los cerebros de estas ratas fueron colectados para inmunotinción. Encontramos que la IRR después de la extinción promueve el regreso del miedo, indicado por altos niveles de inmovilización y bajos niveles de palanqueo en comparación con el grupo control (no-IRR), durante la prueba de regreso del miedo. En contraste, estos efectos en los niveles de miedo (inmovilización y palanqueo) no se observaron cuando la IRR ocurrió antes o en ausencia del entrenamiento de extinción, sugiriendo que los efectos observados son dependientes de extinción. De manera importante, utilizando la expresión de c-Fos como un marcador de actividad neuronal, encontramos que los altos niveles de miedo encontrados cuando la IRR se realizó después de la extinción, reduce la actividad neuronal de regiones particulares. Por un lado, regiones específicas del hipocampo (CA3) y la corteza prefrontal (corteza infralímbica) fueron regiones que disminuyeron su actividad en el grupo IRR en contraste con el grupo no-IRR. Esto sugiere que el bloqueo de neurogénesis después de la extinción promueve el regreso miedo al impedir que se activen regiones prefrontales necesarias para evocar la memoria de extinción. Por otro lado, la actividad de la hipófisis lateral en el grupo IRR fue mayor con respecto al grupo no-IRR, sugiriendo que el bloqueo de neurogénesis promueve el regreso del miedo al activar una región cerebral implicada en la señalización aversiva.

En conclusión, nuestros resultados indican que el bloqueo de la neurogénesis hipocámpal después de la extinción promueve el regreso del miedo, modificando la

actividad de los circuitos involucrados en la expresión de la memoria de condicionamiento y de la extinción. Nuestros hallazgos sugieren la posibilidad de que el bloqueo de neurogénesis después del entrenamiento de extinción debilite la memoria de extinción y por ello la memoria de miedo prevalece. Nuestra investigación puede tener relevancia clínica para tratamientos de desórdenes psiquiátricos (fobias, estrés post-traumático, etc.), en los cuales los pacientes tienen problemas para inhibir memorias de miedo.

4. Introducción

4.1. Miedo

4.1.1. ¿Qué es el miedo?

El miedo es una respuesta adaptativa de defensa ante una situación de peligro (Darwin, 1872; Bendesky y Bargmann, 2011). El miedo permite evaluar situaciones peligrosas y efectuar respuestas adecuadas ante ellas (LeDoux, 2000). Estas respuestas de defensa son desencadenadas tanto por mecanismos innatos como aprendidos, (LeDoux, 2012). Un ejemplo de miedo innato que se observa en la naturaleza, es la relación presa-depredador. Se ha observado que en primates, la presencia de señales parecidas a serpientes o arañas promueve una respuesta de defensa (Amaral, 2003). No obstante la mayoría de los miedos se adquieren a través de la experiencia, es decir son aprendidos (LeDoux, 2000; Bendesky y Bargmann, 2011).

Los animales pueden aprender a asociar factores externos con la expresión de miedo. Por ejemplo, si una presa bebe agua cerca de un arroyo y es atacado por algún depredador, el miedo que generará ya no sólo será innato, estará sujeto a la experiencia que vivió en aquel lugar, y por lo tanto una asociación del arroyo con la mala experiencia generará una respuesta de miedo. Estos mecanismos, de forma simplificada, se pueden estudiar experimentalmente en los laboratorios mediante protocolos de condicionamiento al miedo.

4.1.2. Condicionamiento al miedo

Cuando un estímulo sin ningún significado se asocia con una consecuencia aversiva, este adquiere un significado peligroso. Esto es lo que se conoce como condicionamiento al miedo (LeDoux, 2000). En el condicionamiento al miedo, un estímulo inicialmente neutro pasa a ser un estímulo condicionado (EC), cuando se acompaña de un estímulo naturalmente aversivo conocido como estímulo incondicionado (EI). Así la asociación del EC y el EI da lugar a una memoria de miedo (LeDoux, 2000; Maren, 2001; 2005).

Uno de los protocolos a los que se recurre con mayor frecuencia, es la utilización de una descarga eléctrica como EI. Los animales reciben un choque eléctrico en las patas después de la presentación del EC, este puede ser un tono, un olor o un lugar (Pavlov, 1927). La finalidad del condicionamiento es que al presentar repetidas veces el EC seguido del EI, los animales tendrán miedo cuando se presente el EC en ausencia del EI. Esta herramienta es utilizada porque se puede enseñar a los animales a tener miedo a ciertos objetos y/o situaciones para posteriormente evaluar las conductas de expresión de miedo. Algunas de las conductas de miedo que se manifiestan en el condicionamiento, son la inmovilización, la disminución de la búsqueda de comida, la defecación y micción descontroladas. Cuando se presenta la inmovilización, esta se caracteriza por la ausencia de movimiento, a excepción del causado por la respiración y el movimiento de vibras (LeDoux, 2000). La inmovilización o congelamiento, es considerado actualmente la forma estándar de cuantificar la expresión del miedo (LeDoux, 2000; Maren, 2001). En el condicionamiento al

miedo, el EC puede variar (Maren, 2008): dentro de los más utilizados están el condicionamiento al tono donde el EC es un estímulo auditivo, también se han utilizado estímulos gustativos (García et al, 1968) y el lugar donde ocurre la experiencia como estímulo contextual (Bouton *et al.* , 2006).

Los estímulos contextuales siempre están presentes, aunque no sean el EC *per se*. Estos estímulos pueden ser el lugar donde se llevó a cabo el condicionamiento, el momento, el estado de ánimo, eventos recientes o el paso del tiempo (Bouton, 2002). Este componente contextual es importante para expresar la memoria de miedo, debido a que la representación del lugar donde algún evento aversivo ocurrió, permite evocar la memoria de miedo (Bouton, 2002; Bouton *et al.*, 2006). Por esta razón es importante considerar el componente contextual de una memoria de miedo.

Asimismo, el condicionamiento del miedo y su expresión requieren de la activación de una serie de regiones cerebrales que forman un circuito neuronal. Los circuitos neuronales relacionados tanto con el aprendizaje como con la expresión del miedo se conocen relativamente bien. (LeDoux, 2000; Maren, 2001). A continuación, se describen las regiones cerebrales que componen el circuito neuronal del miedo (Figura 1).

4.1.3. Circuito neuronal del miedo

Los paradigmas experimentales de condicionamiento al miedo facilitan la evaluación de las estructuras cerebrales que participan en la respuesta de miedo. Se ha descrito que la amígdala es una estructura importante durante la

adquisición, la consolidación y evocación de la memoria de miedo (Murphy *et al.*, 1991; Maren, 2001; 2003b). Por otro lado, el hipocampo (Phillips y LeDoux, 1994; LeDoux, 2000; Bouton, 2002; Bouton *et al.*, 2006), la corteza prefrontal medial (CPFm) (Knapska *et al.*, 2012) y recientemente la habénula (Matsumoto y Hikosaka, 2007), son regiones involucradas en la expresión de la memoria de miedo. Cada una de estas estructuras se encarga de reclutar la información necesaria para expresar la memoria de miedo (Figura 1).

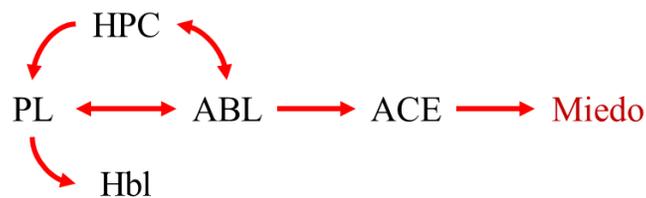


Figura 1 Circuito de expresión de miedo. El hipocampo (HPC) manda información contextual a la PL que a su vez se comunica con la ABL y Hbl para señalar peligro. Posteriormente la ABL excita a la ACE para dar una respuesta de miedo.

Amígdala. La amígdala se subdivide comúnmente en dos regiones funcionales, la amígdala basolateral (ABL) y la central (ACE) (Maren, 2003a; Orsini y Maren, 2012). La ABL presenta dos tipos de neuronas, las neuronas piramidales y las interneuronas GABAérgicas. Las neuronas piramidales son

glutamatérgicas (excitatorias), presentan forma alargada y con gran densidad de espinas. Por otro lado, las interneuronas GABAérgicas (inhibitorias) son de menor tamaño que las piramidales, son delgadas y contienen menos densidad de espinas. De igual manera, la ACE contiene interneuronas GABAérgicas de diferentes tipos. Algunas son más alargadas y con mayor densidad de espinas, mientras que otras poseen un soma pequeño y menos espinas (Orsini y Maren, 2012).

La ABL recibe información sensorial como las descargas eléctricas, así como señales auditivas. Asimismo la ABL recibe proyecciones del hipocampo, una estructura encargada de integrar la información contextual (Jin y Maren, 2015). Debido a lo anterior, se ha propuesto que la ABL es la responsable de la asociación EC-EI durante el condicionamiento al miedo (Maren, 2001; Orsini y Maren, 2012). Además, esta estructura es el primer lugar en dónde llega la información del condicionamiento dentro de la amígdala y se realiza la adquisición de la memoria de miedo. Para que la amígdala efectúe una respuesta, es necesario que la información de la ABL pase a al ACE. Cuando la información llega a la ACE, esta puede comunicarse con otras estructuras como la sustancia gris periacueductal (SGP) o el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo. La actividad de estas estructuras causarán respuestas de miedo como inmovilización o incremento de la tasa respiratoria, respectivamente (LeDoux, 2000; Maren, 2001; Orsini y Maren, 2012).

Varios estudios han mostrado la participación de la amígdala utilizando paradigmas de condicionamiento al miedo (Jimenez y Maren, 2009). Uno de estos trabajos mostró que si se lesionaba la amígdala antes de realizar un

condicionamiento contextual en donde se asociaba un choque eléctrico con un lugar, los animales lesionados no condicionaban (Blanchard y Blanchard, 1972). En otra investigación, animales que habían sido lesionados en la amígdala presentaron dificultad durante la adquisición y la retención de las respuestas de miedo durante un condicionamiento en donde se asociaba un tono con la presentación de un choque eléctrico (Goldstein, 1965). Estos estudios respaldan la participación de la amígdala en las memorias de miedo.

Corteza medial prefrontal. La CPFm es una estructura que presenta una subestructura importante para la expresión del miedo llamada corteza prelímbica (PL)(LeDoux, 2000). Varios estudios han demostrado que la actividad de la PL reduce la expresión del miedo condicionado, no así el miedo innato, por lo que siempre que exista miedo condicionado la PL estará activa (Corcoran y Quirk, 2007). Asimismo, se ha demostrado que si se estimula la PL los animales muestran conductas de miedo como inmovilización o supresión de palanqueo (Vidal-Gonzalez *et al.* , 2006). Por otro lado, utilizando inmunohistoquímica de c-Fos, marcador de actividad neuronal (Murphy *et al.*, 1991), se han observado gran número de núcleos activos en la PL asociados a expresión del miedo condicionado (Knapska y Maren, 2009). Además de la participación de esta corteza en la expresión del miedo condicionado, la PL es una estructura que se conecta con la BLA para promover las respuestas de miedo. Debido a esto es que la PL es una región importante en el circuito de miedo (Sotres-Bayon *et al.* , 2012).

Hipocampo. Durante el condicionamiento no sólo es importante lograr la asociación entre el EC-EI; las señales contextuales que están presentes en el lugar juegan un papel imprescindible durante el condicionamiento. El hipocampo es la región que integra la información contextual durante el condicionamiento (Ji y Maren, 2007). Esta región es una estructura cerebral que se ubica en el interior del lóbulo temporal. Es considerado una invaginación de la arcuocorteza en los mamíferos conformado por el giro dentado (GD) y una estructura llamada *cornu ammonis*. Este último se subdivide en varias regiones diferenciadas en conectividad y citoarquitectura (CA1, CA2 y CA3) (Figura 1) (Amaral y Witter, 1989; Amaral, 1993).

El hipocampo recibe información de otras regiones del cerebro por la vía perforante, proveniente de la corteza entorrinal. La información llega al giro dentado y pasa al siguiente relevo que es CA3. Posteriormente la información puede ir hacia CA1 u otras regiones cerebrales. CA1 puede enviar información al subículo (SUB) y otras zonas del cerebro (Martinez-Canabal, 2013).

CA1 tiene tres principales vías aferentes. La primera son las colaterales de Schaffer provenientes de las neuronas ipsilaterales de CA3. La segunda, son las fibras comisurales que se originan en la parte contralateral de CA3. La tercera vía son las provenientes de la corteza entorrinal. Las conexiones eferentes de CA1, se conectan principalmente con el Subículo, la corteza entorrinal, la amígdala, corteza prefrontal medial, el bulbo olfatorio y otras partes del hipocampo (Amaral y Witter, 1989).

CA2 es una región pequeña y muchas veces se le considera parte de CA3. Ambas estructuras presentan el mismo tipo de neuronas, sin embargo;

CA2 no presenta *stratum lucidum* (Amaral y Witter, 1989). CA3 presenta conexiones aferentes provenientes de las fibras musgosas del GD, principalmente con conexiones excitatorias. Además de estas conexiones, también recibe aferencias por parte de la corteza entorrinal. Las conexiones eferentes de CA3 son las que se forman con las colaterales de Schaffer, son eferencias excitatorias que conectan tanto en CA3 como en CA1 (Amaral y Witter, 1989) (Figura 2).

El GD contiene la gran mayoría de células excitatorias del hipocampo, y es el lugar de entrada de información principal del hipocampo. Esta zona tiene restringida la entrada de aferencias debido a que se encuentra rodeada de piamadre. El GD manda proyecciones a CA3 a través de las fibras musgosas (Figura 3). Estas conexiones proyectan tanto a CA3 como a la capa molecular del GD (Amaral y Witter, 1989; Amaral, 1993; Martínez-Canabal, 2013).

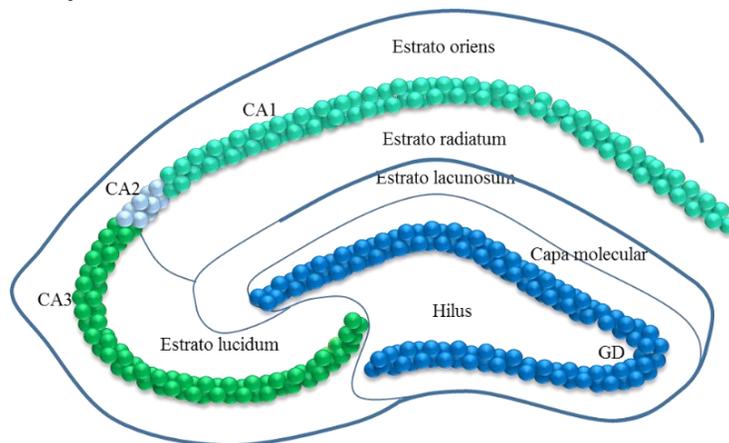


Figura 2 Estructura del hipocampo. El hipocampo está conformado por el giro dentado (GD), CA3, CA2 y CA1. El GD presenta dos capas principales, la capa granular y la capa molecular. Se encuentra rodeado por el estrato *radiatum*. La región entre el GD y CA3 es el *Hilus*. El estrato *lucidum* delimita a CA3. Por otro lado, el estrato *radiatum* delimita a CA2 y CA1. Estas

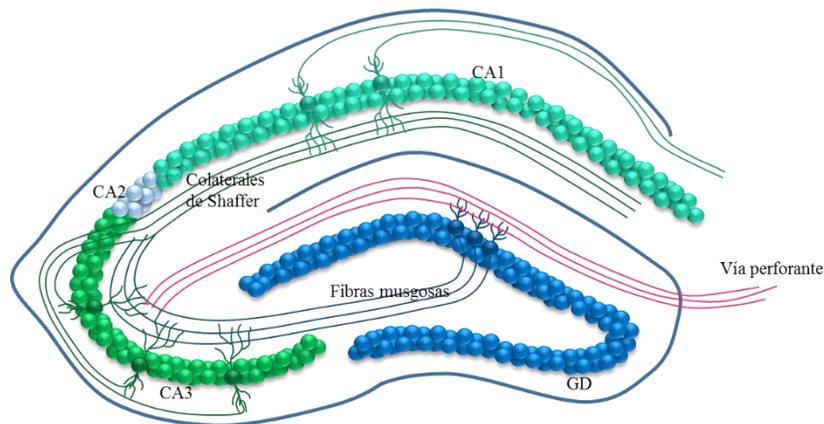


Figura 3 Conectividad dentro del hipocampo. La principal entrada de información del hipocampo es a través de la vía perforante. Esta envía proyecciones hacia el GD y CA3. El GD se comunica con CA3 por medio de las fibras musgosas. CA3 envía información a CA1 a través de las colaterales de Shaffer, que también conecta con sí misma.

El GD presenta una característica única, es una de las zonas del cerebro que durante la vida adulta puede generar neuronas nuevas en la mayoría de los mamíferos (Kaplan y Hinds, 1977) y aves (Goldman y Nottebohm, 1983). Las neuronas nuevas se generan en una zona entre el *hilus* y la zona granular, la cual es llamada zona subgranular.

La *neurogénesis* es un proceso que implica varias fases: división, proliferación, maduración y su posterior integración al circuito. Estas neuronas nuevas surgen a partir de células troncales que se dividen asimétricamente. Aunque nacen varias células, la gran mayoría mueren pocos días después de la división celular. Las células que sobreviven maduran y adquieren el fenotipo de neuronas o, en esta fase se establecen las conexiones, crecen los axones y las dendritas. Todo el proceso de neurogénesis, desde que nacen hasta que se diferencian en neuronas maduras capaces de integrarse en circuitos de memoria dura entre 4 y 6 semanas (Martinez-Canabal, 2013; Kempermann *et al.* , 2015).

Durante la primera semana después de la división las neuronas están confinadas en la capa granular; sus dendritas son cortas y están en la capa granular además, estas no poseen espinas. Posterior a la tercera semana las neuronas nuevas comienzan a establecer conexiones aferentes, y presentan un umbral bajo de voltaje para realizar un potencial de acción. A partir de la cuarta semana, las neuronas completan su maduración, los axones se conectan con CA3 y las dendritas llegan a la capa molecular del GD, (Martinez-Canabal, 2013) (Figura 4).

Para detectar la existencia de neurogénesis es muy común utilizar marcadores que permitan ver alguna parte del proceso. La Doblecortina (DCX) es una proteína asociada a microtúbulos, su nombre proviene del síndrome de corteza doble, el cual se caracteriza por la incapacidad de las neuronas nuevas de migrar. DCX se puede detectar a partir de los 2 días después de la división celular y hasta el mes de edad de las neuronas hijas, por lo tanto es un marcador ampliamente utilizado para cuantificar el número neuronas nuevas (Brown *et al.*, 2003).

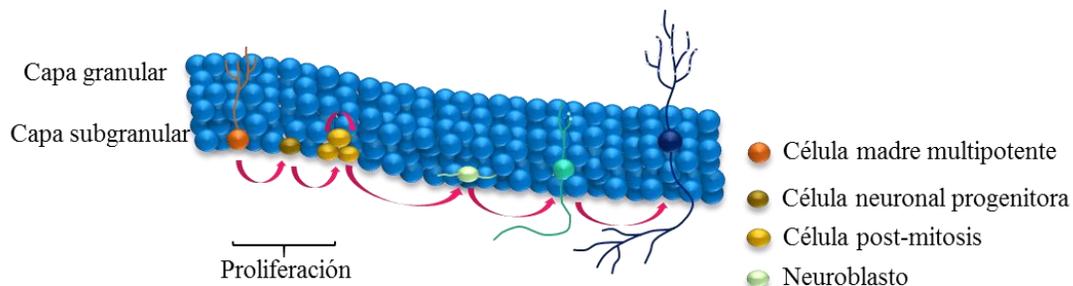


Figura 4 Neurogénesis. Una célula madre multipotente da lugar a una célula neural progenitora. Por división mitótica asimétrica, proliferan las células nuevas. Posteriormente adquieren el fenotipo neuronal y comienzan a formarse los procesos que darán lugar a las dendritas. Las neuronas inmaduras migran hacia la capa granular, comienzan a elongarse las dendritas y presentan pocas espinas. Las neuronas maduras tienen un axón bien formado y presentan varias espinas. Es en este momento cuando

El hipocampo es una estructura bastante estudiada dentro de las neurociencias debido a que es el encargado de asociar las pistas contextuales durante cualquier evento aversivo (Fanselow, 2000). Los primeros estudios en donde se realizaron lesiones electrolíticas se observó que se afectaba tanto la adquisición como la evocación de la memoria de condicionamiento contextual (Phillips y LeDoux, 1994; Maren, 1999). Otras investigaciones han encontrado que si no es asociado correctamente el contexto durante el condicionamiento, la adquisición de la memoria de condicionamiento no se realiza (Fanselow, 1990). Es por ello que el hipocampo es una estructura importante durante la adquisición y expresión del miedo.

Como ya se ha mencionado, el hipocampo es una de las estructuras que durante la vida adulta presenta neurogénesis. Durante varias décadas se ha estudiado el posible papel que juega este fenómeno en los procesos de memoria (Leuner *et al.* , 2004). Las primeras décadas después del descubrimiento de la neurogénesis, se creyó que las nuevas neuronas deberían de tener un papel positivo en la memoria, por ello, si se removía la neurogénesis, los resultados esperados en la memoria serían negativos. Se ha observado que si se reduce la neurogénesis usando MAM (acetato de metilazoxymetanol) los animales no pueden realizar correctamente tareas dependientes de hipocampo (Shors *et al.* , 2002b). En otro estudio, usando ratas adultas de 16 meses de edad, en las cuales la neurogénesis es menor debido a su avanzada edad, muestran problemas en el laberinto acuático de Morris (Drapeau *et al.* , 2003). Un estudio utilizando irradiación como método de ablación de la neurogénesis, encontraron

déficits en el condicionamiento contextual al miedo (Snyder *et al.* , 2005; Winocur *et al.* , 2006). De manera opuesta, existen estudios en donde utilizando MAM para reducir la neurogénesis, no se encontraron efectos en las tareas dependientes de hipocampo (Shors *et al.* , 2002a) o en el condicionamiento contextual (Zhang *et al.* , 2008).

Además de los estudios en donde se disminuye la neurogénesis, también se han realizado investigaciones en donde se aumenta el nivel de las neuronas nuevas para dilucidar el efecto en la memoria. El uso del enriquecimiento ambiental y el ejercicio, son las técnicas más comunes para aumentar el nivel de neurogénesis (van Praag *et al.* , 1999). Durante varias décadas se ha establecido que incrementar la neurogénesis tiene efectos positivos en la memoria. Un estudio en donde se realizó enriquecimiento ambiental antes de ejecutar un laberinto acuático de Morris, los animales se desempeñaron de mejor manera en la tarea e incrementaron el número de neuronas nuevas (van Praag *et al.*, 1999). Sin embargo, en otro estudio en donde se aumentó la neurogénesis con ejercicio, mostró que los animales se desempeñaban peor en el laberinto acuático de Morris (Akers *et al.* , 2014).

A principios de los 2000s un grupo de investigadores realizaron un experimento con ratones con una mutación en el gen PS1, que impide la generación de nuevas neuronas. Los animales fueron sometidos a enriquecimiento ambiental. Se encontró que los animales con la mutación, en una prueba en donde se evaluó la memoria de miedo, presentaron mayor miedo sólo si el enriquecimiento se realizaba *después* de la adquisición de la memoria

del miedo (Feng *et al.* , 2001). Una década después, se retomó la idea de Feng de realizar la manipulación de la neurogénesis después de la adquisición de la memoria. En este nuevo estudio se utilizó ablación de neurogénesis usando animales transgénicos TK inducibles, estos ratones no podían generar nuevas neuronas. Los animales fueron condicionados a un contexto y posteriormente se les aumento la neurogénesis usando ejercicio voluntario. Los animales con neurogénesis aumentada presentaron menores niveles de miedo, no así los transgénicos (Akers *et al.*, 2014)

Todos estos estudios sobre el papel de la neurogénesis en las memorias dependientes de hipocampo arrojan resultados opuestos y poco claros. Sin embargo, es evidente que cuando los niveles de neurogénesis son afectados *antes* de la adquisición de la memoria no hay un consenso sobre como la memoria se ve afectada (Shors *et al.*, 2002b; Snyder *et al.*, 2005; Zhang *et al.* , 2016). Por otro lado, cuando se realiza la manipulación de los niveles de neurogénesis *después* de la adquisición de la memoria, se encuentran efectos más robustos en la conducta, como en los estudios ya mencionados (Feng *et al.*, 2001; Akers *et al.*, 2014).

Habénula. Una de las regiones cerebrales que ha llamado la atención los últimos años, ha sido la habénula. Una de la razones para considerar a la habénula, es que es una estructura conservada dentro de todos los vertebrados. Dentro de los mamíferos, se encuentra en la parte posterior dorsal medial del tálamo y se divide en la habénula lateral medial y la habénula lateral (Hbl) (Hikosaka, 2010). Además, se ha descrito que la Hbl tiene conexiones

provenientes de la CPFm (Kim y Lee, 2012) las cuales podrían estar mandando información aversiva durante el condicionamiento. Se ha visto que la habénula se activa cuando un animal está en presencia de señales aversivas, como los choques eléctricos durante el condicionamiento (Matsumoto y Hikosaka, 2007). Por otro lado, una investigación encontró que la Hbl está asociada con la actividad del hipocampo y que a su vez esto afecta conductas dependientes de hipocampo. Sin embargo, no existe evidencia anatómica de que estas estructuras se conecten (Goutagny *et al.*, 2013). A pesar de que su papel en las memorias de miedo no ha sido muy estudiada, un trabajo realizado en pez cebra, mostró que la inactivación de la Hbl afectaba las respuestas de miedo condicionado (Agetsuma *et al.*, 2010). Debido a toda esta evidencia, es probable que la habénula sea una estructura que participa para señalar información aversiva durante el condicionamiento.

La memoria de miedo nos ayuda a enfrentar situaciones de peligro, sin embargo, es necesario aprender a distinguir cuando una situación deja de ser peligrosa. La memoria de miedo que se genera a partir del condicionamiento puede ser inhibida. Esta inhibición consiste en aprender que el EC ya no predice el evento aversivo, de esta manera formamos una memoria de inhibición que compite con la memoria de condicionamiento. Así como en el laboratorio se utiliza el condicionamiento para entender la expresión del miedo, existe un paradigma conductual para entender como inhibimos el miedo llamado extinción del miedo.

4.2. Extinción

4.2.1. ¿Qué es la extinción?

El miedo, como ya se ha mencionado, es una respuesta adaptativa importante para mantenernos con vida. No obstante, es importante recordar que una situación no siempre será peligrosa y debemos aprender a inhibir el miedo. Para estudiar cómo se aprende a inhibir el miedo existe una herramienta conductual llamada extinción del miedo (Quirk y Mueller, 2008).

La extinción consiste en la repetición del EC, como contexto, sin la presencia del EI, como un choque eléctrico (Pavlov, 1927). Al terminar con la sesión de extinción, cuando los animales estén expuestos al EC, este ya no causará las conductas de miedo aprendidas durante el condicionamiento. De la misma forma que en el condicionamiento, cuando un animal se somete al proceso de extinción, está formando una memoria nueva que no reemplaza la del condicionamiento (memoria de extinción) (Bouton, 2002). Aunado a esto, se ha establecido que la extinción es un proceso dependiente del contexto. Cuando se realiza la extinción, el EC ya no predice peligro; sin embargo, está limitado al contexto donde se lleve a cabo. Si el EC se presenta fuera del contexto donde se realizó la extinción, este promoverá las respuestas de miedo adquiridas durante el condicionamiento (Maren, 2005; Ji y Maren, 2007).

El lugar y el tiempo donde se realiza la extinción son características contextuales importantes para que se inhiba el miedo. Se ha observado que si el EC se presenta fuera del contexto de extinción, la memoria de miedo se expresa, esto se llama renovación (Bouton, 2004). Otro fenómeno que puede

sucedir es que el EI sea presentado fuera del contexto de extinción promoviendo las respuestas de miedo, esto se llama reinstalación (Rescorla y Heth, 1975). Además de los dos fenómenos ya mencionados, existe uno más en donde el miedo regresa tiempo después de que se haya realizado la extinción, llamado recuperación espontánea (Bouton, 2004). Todos estos fenómenos que presenta la extinción están asociados al componente contextual temporal y/o espacial, y a pesar de que la extinción sea exitosa, la memoria de miedo prevalece sobre la de extinción. Asimismo, estos fenómenos han sido estudiados exhaustivamente con el fin de encontrar la manera de promover que la memoria de extinción prevalezca sobre la de condicionamiento. Así como en el condicionamiento, en la extinción también existen circuitos que subyacen esta memoria. Estos circuitos se describirán brevemente a continuación.

4.2.2. Circuito neuronal de la extinción del miedo

Al igual que en el condicionamiento, la extinción depende de la comunicación entre varias estructuras cerebrales. La amígdala, la corteza medial prefrontal (CPFm) (Sotres-Bayon y Quirk, 2010) y el hipocampo (Ji y Maren, 2007), son estructuras que tienen un rol importante durante la adquisición, consolidación y evocación de la extinción (Quirk y Mueller, 2008). La interacción de estas tres estructuras ha sido ampliamente estudiada, concluyendo que son necesarias durante el entrenamiento de extinción (Sotres-Bayon *et al.*, 2012). Por otro lado, la Hbl también ha sido implicada durante la extinción (Zhang *et al.*, 2016) (Figura 5).

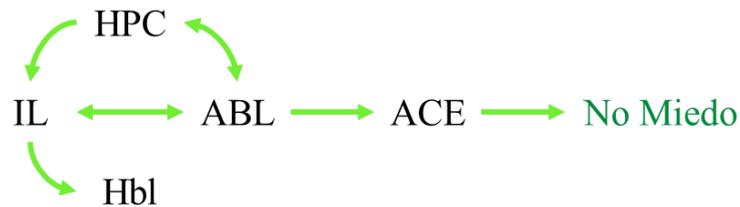


Figura 5 Circuito de inhibición del miedo. El HPC manda información contextual a la IL que a su vez se comunica con la Hbl que inhibe las respuestas aversivas. La IL inhibe la actividad de la ABL para disminuir las respuestas de miedo.

Amígdala. La amígdala es la estructura por excelencia en donde se realiza la adquisición de la memoria de condicionamiento, por lo que es la región en donde se comenzó a estudiar el proceso de extinción (LeDoux, 2000). La ABL ha sido estudiada ampliamente, y se ha visto que existe una correlación entre la actividad eléctrica de la ABL y la presencia del EC posterior a la extinción (Hobin *et al.* , 2003). Asimismo, cuando se inhiben los receptores NMDA de la amígdala se ve afectada la adquisición y evocación de la memoria de extinción (Sotres-Bayon *et al.* , 2007). No obstante, se ha observado que lesiones de la ABL no afecta el entrenamiento de extinción (Sotres-Bayon *et al.* , 2004). Estos estudios respaldan la participación de la amígdala durante el entrenamiento de extinción.

La actividad de la amígdala por sí sola no es suficiente durante la extinción, es necesaria la comunicación con otras estructuras. Se conoce que la amígdala se conecta con la CPFm y el hipocampo para orquestar en conjunto la adquisición y expresión de la memoria de extinción (Ji y Maren, 2007; Sotres-

Bayon *et al.* , 2009; Sotres-Bayon *et al.*, 2012). Por lo que es importante comprender cuál es el papel específico de cada una de estas regiones.

Corteza medial prefrontal. Las investigaciones que se han realizado acerca de las regiones que participan durante la extinción, han puesto énfasis en la CPFm. Recordemos que la PL se ha visto implicada cuando el miedo es alto, por otro lado; la IL es una región que realiza la actividad opuesta. Se ha observado que si la IL es inactivada antes de realizar la extinción, los animales expresan altos niveles de inmovilización (Sierra-Mercado *et al.* , 2006). Otro estudio estableció que al bloquear los receptores NMDA de la IL disminuye la tasa de disparo afectando la consolidación de la memoria de extinción (Burgos-Robles *et al.* , 2007). Asimismo, se ha demostrado que la IL se encarga de modular la actividad entre la ABL y ACE a través de las células intercaladas de la amígdala (CI). Las CI se conectan con la ACE que permite inhibir las respuestas de miedo, siendo necesarias para el aprendizaje de extinción (Likhtik *et al.* , 2008; Manko *et al.* , 2011). Debido a esta evidencia, la IL es una región importante para comprender el circuito que subyace la inhibición del miedo por medio del entrenamiento de extinción.

Hipocampo. Además de la interacción entre la CPFm y la amígdala, el hipocampo también se ha visto implicado en la expresión de las memorias de extinción, debido al componente contextual de la extinción (Fanselow, 2000; Maren, 2001; Bouton, 2004). La inactivación del hipocampo dorsal antes de la extinción impide el aprendizaje de extinción; por lo que afecta tanto la adquisición

como la evocación de la memoria de extinción (Corcoran y Maren, 2004; Corcoran *et al.* , 2005).

Como ya se ha mencionado, la neurogénesis es importante en la modulación de las memorias dependientes de hipocampo, y es probable que module las memorias de miedo (Besnard y Sahay, 2016). Un estudio importante realizado en 2012, en donde se utilizaron animales transgénicos *knock-out* del factor de transcripción ERK5 inducibles para eliminar la neurogénesis, observaron efectos en la conducta. Estos animales fueron sometidos a un protocolo de condicionamiento y posteriormente extinguieron su miedo. Al realizar una prueba para observar los niveles de miedo, los animales *knock-out* presentaron niveles mayores de miedo en comparación con el control. Esta investigación es pionera en el estudio de la neurogénesis hipocampal en conjunto con la extinción (Pan *et al.* , 2012).

La revisión en la literatura, sugieren que la neurogénesis hipocampal es importante *después* de la adquisición de una memoria dependiente de hipocampo. Asimismo, para reforzar esta idea, se ha observado que las neuronas nuevas son capaces de interactuar con las sinapsis preexistentes (Toni *et al.* , 2007; Akers *et al.*, 2014), por lo que tiene sentido pensar que la manipulación de la neurogénesis hipocampal tiene efecto en la memoria de miedo *después* de la adquisición de esta.

Habénula. La habénula, como ya se ha mencionado, es una estructura poco estudiada dentro del campo del miedo. No obstante, se sabe que participa cuando existen señales aversivas (Matsumoto y Hikosaka, 2007). Por otro lado,

en pez cebra se ha visto que la Hbl está implicada en respuestas de miedo (Agetsuma *et al.*, 2010). Asimismo, un estudio reveló su participación durante la extinción, abriendo la puerta a investigar si es una región importante en las memorias de miedo (Zhang *et al.*, 2016).

Aunque la extinción es un proceso que genera exitosamente una memoria de inhibición del miedo, la memoria de miedo siempre es más fuerte. Como ya se ha mencionado la extinción es un proceso dependiente del contexto donde se lleva a cabo. Cuando se presenta el EC tiempo después de la extinción, este generara las respuestas de miedo asociadas durante el condicionamiento (regreso del miedo). Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado debido a que es importante aprender a distinguir cuando un estímulo ya no predice peligro y es necesario inhibir el miedo. Para abordar este fenómeno, es necesario entender que a pesar que la memoria de condicionamiento y la memoria de extinción son moduladas por las mismas estructuras cerebrales, estas memorias siempre están en competencia. Tanto el circuito de miedo y no miedo se encuentran activados en el momento de que la situación aversiva regresa. Estos circuitos son los encargados de modular la respuesta de miedo Una manera en la que se puede observar el regreso del miedo de manera clínica, es a través de los trastornos psiquiátricos como el estrés post-traumático.

4.3. Regreso del miedo: miedo vs inhibición del miedo.

4.3.1. ¿Qué es el regreso del miedo?

Este fenómeno fue estudiado por primera vez por Pavlov (Pavlov, 1927). Él se cuestionó por qué regresaba el miedo a pesar de una exitosa extinción. En aquellos momentos se creía que la extinción borraba la memoria de condicionamiento. Sin embargo, si esto fuera cierto, cuando se realiza una prueba días después de la extinción, la memoria de extinción sería la que se expresaría y no la de condicionamiento. Debido a que son dos memorias diferentes, existe una competencia entre ellas para inhibir a la otra (Rescorla, 2004; Sotres-Bayon *et al.*, 2006).

El regreso del miedo tiene importancia clínica, debido a que en sujetos con desordenes psiquiátricos, como el trastorno por estrés post-traumático (TEPT), este fenómeno se exagera. El TEPT es una enfermedad en donde podemos observar la importancia de aprender a inhibir el miedo. Los sujetos con TEPT han pasado por una experiencia traumática y tienden a generalizar su miedo sin poder inhibirlo. Aunque la terapia de extinción, o de exposición, se usa comúnmente, el miedo siempre regresa a pesar de las terapias conductuales y farmacológicas (Sotres-Bayon *et al.*, 2006). Debido a esto, se ha planteado estudiar los circuitos involucrados en este proceso y entender cómo se modula esta conducta. El circuito que subyace el fenómeno del regreso del miedo implica la participación de las estructuras involucradas en la expresión e inhibición del miedo (Figura 6).

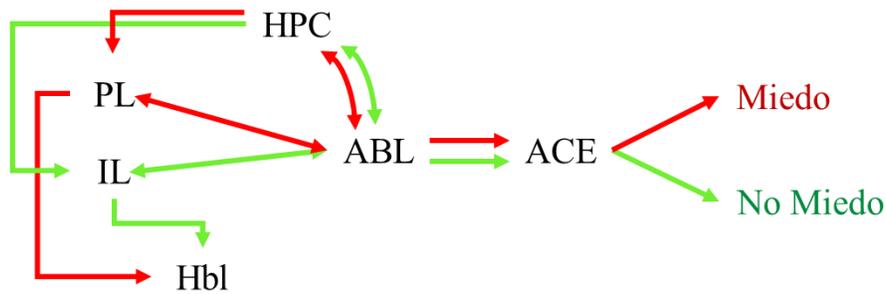


Figura 6. Circuito de miedo VS no miedo. El circuito de miedo (Rojo) y el de no miedo (Verde) requiere de la actividad de las mismas estructuras, sin embargo; es la actividad de la PL o la IL la que señala peligro o no. La PL excita la ABL que a su vez excita la ACE, por otro lado; la IL inhibe la actividad de la ABL.

La amígdala por ser la estructura en donde se lleva a cabo la adquisición del miedo, es una región importante en la cual converge la información necesaria para dar una respuesta de miedo o no. La PL, recordemos, es una estructura que se encarga de dar una señal de miedo a la amígdala, contrario a lo que hace la IL, que envía una señal de inhibición del miedo. Ambas estructuras modulan la dirección de la respuesta de miedo. Por otro lado El hipocampo, contribuye con la información contextual de la memoria de miedo. Es una región en donde se encuentran las pistas contextuales para saber cuando hay o no una situación de peligro. Además de este papel del hipocampo, cuenta con una característica imprescindible que es la generación de neuronas nuevas. A pesar de que se conoce la existencia de la neurogénesis, no se ha estudiado como podría estar implicada en fenómenos como el regreso del miedo.

4.3.2. La neurogénesis hipocampal y su papel en la memoria de miedo.

Debido a la implicación clínica que tiene el regreso del miedo, se han planteado varias interrogantes sobre los mecanismos que subyacen este fenómeno y así lograr que la memoria de extinción perdure por más tiempo. Los estudios realizados para impedir la recuperación espontánea de miedo, han utilizado algunas drogas como la d-cicloserina, yohimbina, agonistas de receptores canabinoides y agonistas de canales de calcio. Sin embargo, ninguno de estos tratamientos ha arrojado los resultados esperados. (Sotres-Bayon *et al.*, 2006).

Se sabe que el hipocampo juega un rol importante al momento de evocar la memoria de miedo. Varios trabajos han observado que si se inactiva el hipocampo se ve afectada la evocación de la memoria de miedo previamente extinguida (Corcoran *et al.*, 2005; Hobin *et al.* , 2006; Maren y Hobin, 2007; Zelikowsky *et al.* , 2014). Todos estos estudios están basados en el componente contextual que acompaña la extinción y el condicionamiento. Además, se ha demostrado que son las conexiones que tiene el hipocampo con la amígdala y la CPFm las que modulan la expresión de la memoria de miedo asociada al contexto (Jin y Maren, 2015).

Dada la implicación del hipocampo durante la extinción del miedo condicionado y su posterior evocación, se ha propuesto que la manipulación de este podría tener efectos en fenómenos como el regreso del miedo (Maren, 2001; Sotres-Bayon *et al.*, 2006). No obstante, es importante mencionar que la neurogénesis hipocampal es un fenómeno que no puede evadirse, el cual

ninguno de los estudios anteriores toman en cuenta. Por ello, en este trabajo se ha planteado saber si la neurogénesis hipocampal es *necesaria* en el regreso del miedo. Dado que los estudios en donde se manipula (incrementan o disminuyen) los niveles de neurogénesis *antes* de la conducta (ya sea de miedo o no) son poco claros (Kitamura *et al.* , 2009; Ko *et al.* , 2009; Pan *et al.*, 2012) y que las neuronas nuevas pueden interactuar con memorias preexistentes (Toni *et al.*, 2007; Akers *et al.*, 2014); es probable que la neurogénesis hipocampal participe *después* de la adquisición de la conducta. Asimismo, puesto que el hipocampo participa tanto en el condicionamiento como en la extinción, puede estar modulando la competencia entre estas memorias, lo cual tendría gran importancia en fenómenos como el regreso del miedo.

5. Planteamiento del problema

EL regreso del miedo es un fenómeno natural que esta exacerbado en pacientes con desordenes psiquiátricos. Se han utilizado varias maneras para atenuar el regreso del miedo, pero ninguna con los resultados esperados. Algunos investigadores han propuesto estudiar ciertas estructuras cerebrales con el fin de resolver esta problemática. Una de las regiones cerebrales que ha llamado la atención durante los últimos años ha sido el hipocampo.

El hipocampo es una estructura que participa en los circuitos relacionados con el miedo, en conjunto con otras estructuras como la corteza medial prefrontal, la amígdala y la habénula. Además, el hipocampo es la estructura donde se crean las representaciones contextuales de la memoria. Por otro lado, es una de las zonas del cerebro de los mamíferos, que durante la vida adulta puede generar nuevas neuronas (neurogénesis). Por esta razón, es una estructura candidata a estudiar para comprender el regreso del miedo. A pesar de esta inconsistencia acerca del papel de la neurogénesis, varios estudios han demostrado que cuando se manipula el nivel de neurogénesis *después* de una conducta, esta se ve afectada.

Debido a lo anterior, en este estudio se propuso disminuir los niveles de neurogénesis para evaluar si existe algún efecto en el regreso del miedo. Para ello, se estableció realizar la manipulación *antes* y *después* de la extinción para saber en qué momento la disminución de la neurogénesis hipocampal afectaba la memoria de miedo. Además, se determinó las regiones cerebrales que se activan durante la evocación de la memoria de miedo.

6. Pregunta de investigación

¿Cuál es el efecto de la disminución de la neurogénesis hipocampal, antes y después de la extinción sobre el regreso del miedo?

7. Hipótesis

La disminución de la neurogénesis hipocampal, después de la extinción, afecta el regreso del miedo.

8. Objetivo

Objetivo General

Determinar si la disminución de la neurogénesis hipocampal altera el regreso del miedo; y qué regiones cerebrales se activan durante la respuesta de miedo.

Objetivos Particulares

- Determinar si la ablación de neurogénesis hipocampal *antes* de la extinción, altera el regreso del miedo.
- Determinar si la ablación de la neurogénesis hipocampal *después* de la extinción, altera el regreso del miedo.
- Determinar si la ablación de neurogénesis hipocampal en ausencia de extinción, altera los niveles de miedo.
- Identificar las regiones cerebrales involucradas en el regreso del miedo.

9. Método

9.1. Animales y aparatos

9.1.1. Animales

Se usaron ratas macho Wistar proporcionadas por el bioterio del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM. Las ratas pesaron entre 190-200 g y tuvieron una edad de aproximadamente 2 meses. Todos los animales, antes de comenzar la conducta, fueron colocados en cajas de acrílico, en un cuarto con un ciclo de luz-oscuridad 12/12 horas. Con temperatura y humedad controladas (22 ± 2 °C). El acceso a la comida (*Pellets*, BioInvert) y agua fue *ad libitum* durante los primeros días antes de comenzar la conducta.

Los animales estuvieron en el vivario del IFC en cajas-hogar individuales (46 cm x 25 cm x 20 cm) antes de que se llevaran a cabo las manipulaciones de la neurogénesis.

9.1.2. Equipo conductual

Se utilizaron cajas operantes (Coulbourn Instruments, medidas; Base: 53.3 cm x 34.9 cm x 1.3 cm, Interior: 30.5 cm x 24.1 cm x 21.0 cm y Exterior: 31.8 cm x 25.4 cm x 26.7cm), con piso color verde grisáceo de acrílico liso. También se utilizaron rejillas con 18 barras metálicas (29.2 cm x 26 cm x 6.1 cm) para realizar e condicionamiento al Miedo Contextual. La rejilla metálica se conecta con un aparato que envía la descarga eléctrica (Coulbourn, Precision Animal Shocker). Esta

consola se controla directamente por la computadora utilizando el software Graphicstate 4.

Los animales fueron monitoreados durante cada conducta utilizando el programa ANY-maze™ (v 4.99, Stoelting Co.), para realizar el análisis conductual durante el condicionamiento, extinción y pruebas (por ejemplo; inmovilización y número de palanqueos).

9.2. Manipulación de la neurogénesis

9.2.1. Irradiación

Para disminuir los niveles de neurogénesis hipocampal, los animales fueron irradiados en la Unidad de Radioneurocirugía del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, en dónde se empleó un acelerador lineal (Novalis) de 6 MV (Megavolts) para radioterapia intracraneal (Figura 7).

Previo a la irradiación se anestesiaron a las ratas usando un coctel de Ketamina (90 mg/kg) y Xilazina (10 mg/kg). Se monitoreó el ritmo cardíaco usando un estetoscopio. Una vez que el ritmo cardíaco fue estable, las ratas fueron colocadas en una base de fijación estereotáxica construida para montarse en la mesa del acelerador lineal. Las ratas control fueron anestesiadas y colocadas en la base para radiar, sin embargo, no recibieron ninguna IRR.

Para llevar a cabo una irradiación focalizada al hipocampo, se realizó una tomografía computarizada craneal de una rata con peso similar al de las ratas que se usaron en los experimentos. Posteriormente, esta imagen se fusionó con un atlas

digital de rata que permitió obtener las coordenadas exactas de la localización del hipocampo. Teniendo estos datos, se irradia el hipocampo mediante arcos circulares, en donde la irradiación incide en el blanco desde diferentes ángulos. Se empleó un colimador circular de 6 mm centrado en el hipocampo y se irradia el hipocampo de forma bilateral (tres arcos por cada lado). El tratamiento se repitió en tres fracciones durante 3 días y en cada fracción diaria se depositó una dosis de 5Gy (Greys = J/Kg) a cada lado del hipocampo, sumando una dosis total de 15Gy.

Al concluir la IRR los animales fueron monitoreados para que su ritmo cardiaco no se desestabilizara y posteriormente se regresaban a su caja-hogar. Al finalizar las sesiones de IRR los animales fueron colocados por grupos de 2-3 ratas por caja, y se mantenían en ellas durante 30 días con acceso libre a comida y agua, antes de realizar la siguiente parte del protocolo experimental.

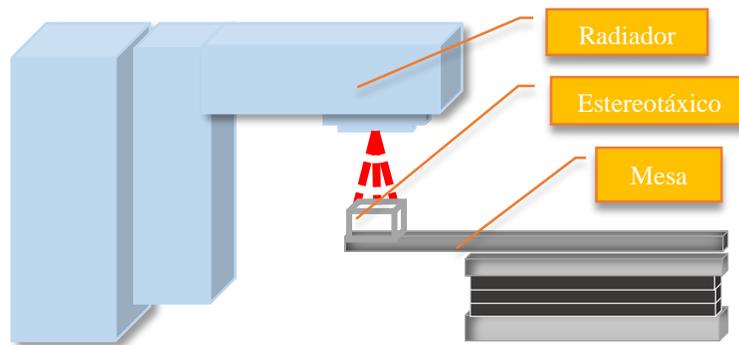


Figura 7. Esquema del acelerador lineal para IRR. En el esquema se muestra el acelerador lineal que se usó para irradiar a las ratas. El lugar donde se encuentra el estereotáxico es donde se colocaron a los animales para que permanecieran inmóviles durante el proceso. El cabezal de la mesa es automatizado y se mueve para que el animal esté en la posición correcta para la IRR.

9.2.2. Enriquecimiento ambiental

Para aumentar los niveles de neurogénesis, se llevó a cabo un protocolo de enriquecimiento ambiental. Este consistía en colocar a los animales por grupos de 2-3 ratas en una caja-hogar, proporcionándoles una rueda de acceso libre para que corrieran en ella, así como un tubo de plástico (30 cm x 20 cm) que usaban como túnel y material de madera para roer (Figura 8). Durante este protocolo las ratas siempre tuvieron acceso libre a comida y agua.

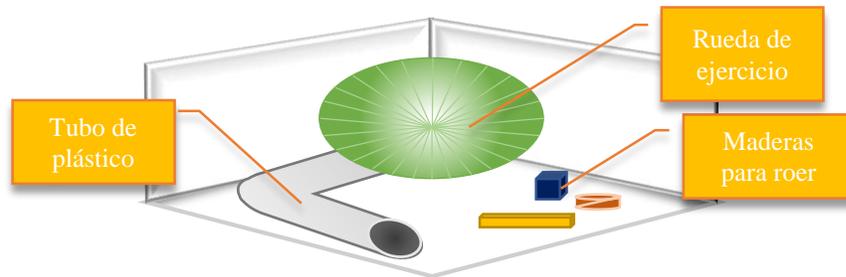


Figura 8. Ambiente enriquecido. Se representa la caja-hogar en donde vivieron las ratas durante el enriquecimiento. Se les colocaba una rueda de acceso libre para hacer ejercicio, un tubo de PVC el cual utilizaban como madriguera y varios objetos de madera para roer.

9.3. Protocolo conductual

9.3.1. Entrenamiento de palanqueo

7.3.1.1 Restricción de alimento

Los animales fueron entrenados para obtener alimento presionando una palanca. Para ello, los animales debían ser privados de alimento y la cantidad de comida que se les daba era controlada (alrededor de 12-15 g por rata) durante todo este protocolo. El primer día que eran colocados en su caja-hogar se pesaron para obtener el peso inicial, posterior a ello se calculaba cuál era el 85-90 % de su peso,

y ese sería el peso blanco al que debían bajar para estar motivados para buscar alimento. Los animales tardaban entre 4-5 días en llegar al peso blanco, y siempre fueron monitoreados para que no tuvieran problemas de salud. El acceso al agua fue *ad libitum*.

7.3.1.1 Contexto de palanqueo

El entrenamiento de palanqueo se realizó en las cajas operantes, usando un contexto específico. Este contexto consistía en piso de plexiglás verde grisáceo, paredes de metal (dos paredes que se encuentran de manera opuesta), y las otras dos paredes de plexiglás transparente estaban tapizadas con líneas negras horizontales o verticales (paredes opuestas). Todo esto se realizó con luz verde (Figura 9).

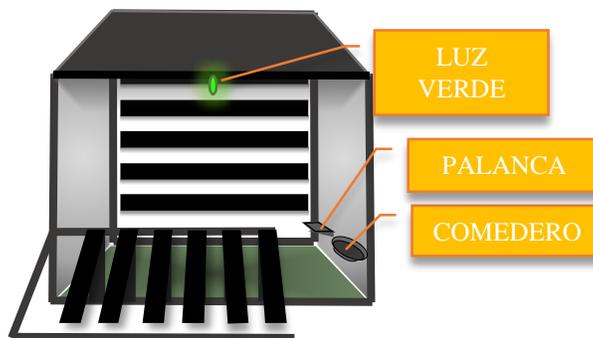


Figura 9. Caja operante con contexto de palanqueo. Se muestra la caja de condicionamiento con la pared posterior tapizadas con líneas negras horizontales, la pared anterior con líneas verticales. El piso gris oscuro y liso. La luz que se utilizó durante todo el entrenamiento de

7.3.1.1 Entrenamiento

Día 1 y 2: El primer día del entrenamiento tenía una duración de 35 minutos, los primeros 5 minutos eran para que los animales se habituaran a la caja operante. En

este primer día, los animales aprendían a asociar el comedero con la disponibilidad de *pellets* de azúcar (Dustless Precision Pellets®, 45 mg, Rodent Purifield Diet, BioServ). Después de lograr esta asociación, aprendía que si se acercaban a la palanca, colocaban una pata sobre de ella o incluso la mordían (Figura 9), los animales recibían un *pellet* de azúcar (recompensa). Estas conductas eran reforzadas hasta que por prueba y error los animales aprendían a palanquear por si solos. El segundo día duraba 30 minutos, durante este día los animales que aún no palanqueaban por si solos, lo intentaban de nuevo. Para reforzar la conducta de palanqueo los animales fueron entrenados durante los primeros 2 días en un programa de reforzamiento de razón fija 1 (RF1). Este reforzamiento consistió en entregar 1 *pellet* por cada palanqueo. Los animales fueron sometidos a este reforzamiento hasta que alcanzaran los 70 palanqueos por 30 minutos.

Día 3, 4, 5 y 6: A partir del tercer día del entrenamiento, los animales fueron sometidos a un programa de reforzamiento de intervalo variable (IV), para aumentar el número de palanqueo por minuto. Este programa consiste en que el reforzador sólo estaba disponible en un momento y este era aleatorio. El tiempo en que tarda en estar disponible el reforzador variaba alrededor de un promedio, es decir; los intervalos entre cada disponibilidad del reforzador promedian un valor establecido. Con base en esto, el tercer día del entrenamiento se sometieron a los animales a un programa de reforzamiento de IV. Durante los primeros 5 minutos fue RF1, y los 25 minutos restantes de IV15; este intervalo consiste en que el promedio de la duración de lo intervalos, antes de la disponibilidad de alimento, era 15 seg. El cuarto día, los primeros 5 minutos eran IV15, y los siguientes 25 minutos eran IV30;

el promedio de la duración de los intervalos previo a la entrega de la recompensa, era de 30 seg. El quinto día, los primeros 5 minutos las ratas pasaban por IV30 y el tiempo restante era IV60; el promedio de la duración de los intervalos era de 60 seg. El último día del entrenamiento, el sexto día, únicamente estaba presente el IV60. La finalidad del IV fue que los animales llegaran a una frecuencia de palanqueo establecida, 12-15 palanqueos por minuto.

9.3.2. Condicionamiento al miedo

Al finalizar el entrenamiento de palanqueo, las ratas eran sometidas a un condicionamiento contextual al miedo (CND). En dónde se buscaba que los animales asociaran un contexto a un evento peligroso. A partir del CND todos los protocolos conductuales fueron realizados en un contexto diferente al de palanqueo. Este contexto consistió en un piso de barras metálicas, dos paredes metálicas y dos paredes de plexiglás transparente sin ningún estampado. La luz en este caso fue blanca y había ruido blanco (conjunto de todas las frecuencias sonoras) durante todo el experimento (Figura 10).

Para lograr asociar este contexto a un evento peligroso, a las ratas se les sometió a 5 choques eléctricos en las patas en la caja operante (1mA de intensidad, 2 seg). El condicionamiento tuvo una duración de 15 minutos, los primeros 5 minutos no se entregaban las descargas y sirvieron para comparar la conducta de los animales antes y después de ser condicionados. Los siguientes 10 minutos se presentaron 5 choques eléctricos aleatoriamente, así los animales no podían predecir el momento de la descarga.

A partir del CND se comenzaron a medir dos conductas para evaluar el miedo. Uno de los parámetros era el palanqueo (usando Graphic State™ para registrar esta conducta); y el otro la inmovilización (usando Any-Maze™ para registrar esta conducta). La inmovilización de una rata se consideró cuando todo el cuerpo estaba inmóvil con excepción de las vibrisas y el tórax. Los parámetros de Any-maze para detectar inmovilización fueron calibrados utilizando previamente análisis manual de los videos.

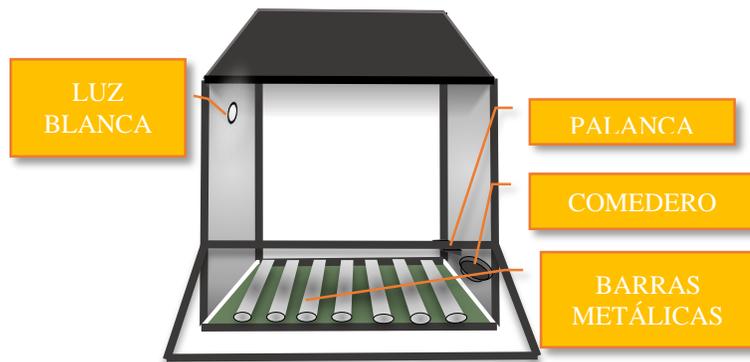


Figura 10. Caja operante, con contexto de condicionamiento. Se muestra la caja dónde se realizaron todas las pruebas conductuales, desde el condicionamiento hasta la prueba 2. Las paredes posterior y anterior de la caja son transparentes sin ningún restampado. El piso consiste en barras metálicas por dónde pasa la descarga eléctrica. La luz que se utilizó fue blanca, además de que estuvo presente todo el tiempo el ruido blanco.

9.3.3. Extinción y pruebas

En la extinción (EXT), los animales asociaban el lugar dónde previamente se realizó el CND, como un lugar ahora seguro. Esto se logró colocando a los animales en el mismo lugar donde se llevó a cabo el condicionamiento durante más tiempo, 50 minutos, pero sin presentar los choques eléctricos. En este caso también se

medía el palanqueo, que aumentaba con respecto al tiempo, y la inmovilización, que disminuía con respecto al tiempo.

Para asegurarse de que la EXT había sido exitosa, un día después de esta los animales fueron sometidos a una prueba (PBA1) para evaluar la respuesta de miedo. Esta prueba consistió en colocar a los animales en el lugar donde había recibido el entrenamiento de extinción durante 10 min. En esta prueba lo que se espera observar es que los niveles de miedo fueran muy bajos, reflejados por poca o nula inmovilización y una cantidad elevada de palanqueos.

Se realizó una prueba 2 (PBA2) que al igual que la PBA1, los animales eran colocados durante 10 minutos en el mismo lugar donde fue realizada la PBA1. Esta prueba tenía como fin evaluar la memoria de miedo. Los animales eran sacrificados por perfusión 90 minutos después para medir la expresión de un marcador de actividad neuronal (c-Fos) o de cantidad de neurogénesis (DCX). Se recuperó su cerebro y se mantuvo en paraformaldehído 4% para ser analizados usando Inmunohistoquímica.

9.4. Experimentos

9.4.1. Experimento Post-Extinción

El experimento Post-Extinción consistió en manipular la neurogénesis *después* de la extinción. Se siguió el siguiente protocolo; el día 1 el condicionamiento, el día 2 la extinción y el día 3 la prueba 1. Posterior a estos 3 días se manipulaban los niveles de neurogénesis y se dejaron pasar 30 días en donde los animales estaban en grupos de 2-3 ratas en una caja-hogar, con acceso

libre a comida y agua. Del día 31 al 37 los animales fueron privados de alimento nuevamente, utilizando el mismo método que en el entrenamiento de palanqueo. El día 38 se realizó la PBA2, para evaluar la recuperación espontánea del miedo.

9.4.1.1. *Post-Extinción IRR*

Para el experimento en donde únicamente se quería evaluar el efecto de la disminución de la neurogénesis con IRR después de la extinción, se realizó el siguiente protocolo: el día 1 se realizó el CND, al siguiente día la EXT y posterior a esta se llevó a cabo la PBA1, fueron radiadas el día 4, 6 y 7, dando un total de tres sesiones de IRR. Al pasar los días de IRR, los animales fueron colocados por grupos de 2-3 ratas en su caja hogar, con acceso libre a comida y agua. Se dejaron pasar 30 días y el día 38 se realizó una prueba para evaluar recuperación espontánea del miedo y pasados 90 min fueron sacrificados por perfusión (Figura 9).



Figura 11. Protocolo Post-Extinción IRR. Se muestra el protocolo que se utilizó en este experimento. Todas las conductas evaluadas fueron realizadas en la misma caja operante. Los días en los que se llevó a cabo cada una de las conductas están señalados. Así como los días en los que se realizó la IRR. El día 38 en todos los experimentos, siempre se ejecutó la prueba

9.4.1.2. Post-Extinción IRR/enriquecimiento

Para el experimento IRR/enriquecimiento, posterior al día 3 de la prueba, las ratas fueron radiadas el día 4, 6 y 7, como en el experimento *Post-Extinción IRR*; sin embargo, al regresarlas a su caja-hogar, esta estaba acondicionada con un ambiente enriquecido. Estuvieron en ambiente enriquecido durante 30 días, el día 38 se realizó la PBA2 para evaluar recuperación espontánea del miedo. Pasados 90 minutos los animales fueron sacrificados por perfusión (Figura 12).



Figura 12. Protocolo Post-Extinción IRR & Enriquecimiento. Se muestra el protocolo que se utilizó en este experimento. Todas las conductas evaluadas fueron realizadas en la misma caja operante. Los días en los que se llevó a cabo cada una de las conductas están señalados. Así como los días en los que se realizó la IRR. Después de cada sesión de IRR los animales eran regresados a su caja-hogar con ambiente enriquecido, y permanecieron en este durante 30 días.

9.4.2. Experimento Pre-Extinción

El experimento Pre-Extinción consistió en que la manipulación de la neurogénesis fue *antes* de la extinción. Se siguió el siguiente protocolo; el día 1 era el CND, al día siguiente era la primera sesión de IRR, los días 2, 4 y 6 fueron las otras sesiones de IRR. Posteriormente se dejaron pasar 30 días en donde los animales estaban en grupos de 2-3 ratas en una caja-hogar, con acceso libre a comida y agua. Cumplidos los 30 días, se privaban a los animales durante 5 días. El día 36 se realizó la EXT, el día 37 la PBA1 y finalmente la PBA2 el día 38, cuando fueron sacrificados por perfusión 90 min después (Figura 13).

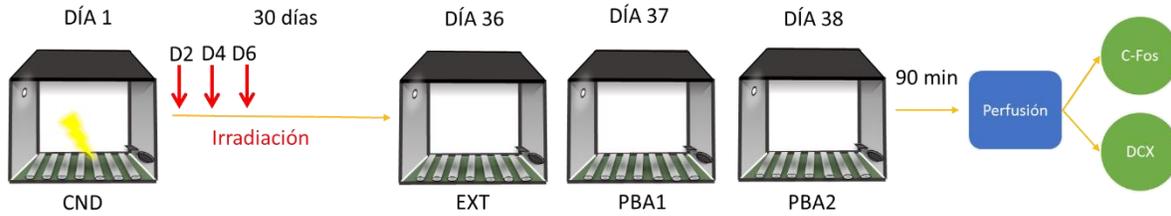


Figura 13. Protocolo Pre-Extinción. Se muestra el protocolo que se utilizó en este experimento. Todas las conductas evaluadas fueron realizadas en la misma caja operante. Los días en los que se llevó a cabo cada una de las conductas están señalados. Así como los días en los que se realizó la IRR. La IRR se realizó antes de la EXT.

9.4.3. Experimento No-Extinción

El experimento No-Extinción consistía en que *no* existía entrenamiento de extinción. El protocolo que se siguió fue el siguiente: el día 1 y 2 se llevó a cabo el CND y la PBA1 (la PBA1 se mantuvo para ser consistentes con el número de pruebas de los demás experimentos), respectivamente, del día 3 al 5 los animales fueron irradiados, posterior a ello pasaron 30 días en su caja-hogar y el día 38 se realizó la PBA2. Ese día los animales fueron sacrificados por perfusión 90 min después de que concluyera la PBA2 (Figura 14).



Figura 14. Experimento No-Extinción. Se muestra el protocolo que se utilizó en este experimento. Los días en los que se llevó a cabo cada una de las conductas están señalados. Así como los días en los que se realizó la IRR. Después de la PBA1 se llevó a cabo la IRR, en este experimento los animales no experimentaron EXT.

9.10. Inmunohistoquímica

9.10.1. Perfusión y preparación del cerebro

Después de cada PBA2 los animales fueron sacrificados para realizar Inmunohistoquímica. Pasados 90 minutos después de la prueba 2, los animales fueron anestesiados usando hidrato de cloral (400 mg/kg, 240mg/mL, Sigma), y posteriormente fueron perfundidos. Los animales ya anestesiados fueron colocados en posición decúbito supino sobre una rejilla metálica. Usando unas tijeras de disección se realizó una incisión en la parte medial del tórax por debajo del esternón. Posterior a ello se cortó a ambos lados de la caja torácica para levantarla y exponer el corazón. Inmediatamente después, se tomaba la punta del corazón con una pinza de disección y se insertaba una aguja sin bisel en el ventrículo izquierdo. Esta aguja estaba conectada con una manguera de perfusión que permitía el flujo de sustancias, este líquido era impulsado gracias a una bomba de perfusión (Masterflex L/S, 772400-00, 100 rpm). Con la aguja ya colocada en el corazón, se cortaba la aurícula derecha para permitir que la sangre fluyera. Para limpiar la sangre se infundieron primero 200 mL de solución salina 0.9% (Baker), hasta que el líquido fuera transparente, y posteriormente se infundía 200 mL de paraformaldehído 4% (Sigma) como fijador. Al terminar con la perfusión, se cortaba la cabeza de la rata y se obtenía su cerebro, el cual se conservó en paraformaldehído 4%.

Los cerebros fueron conservados en paraformaldehído 4% durante al menos 1 semana. Pasado ese tiempo los cerebros se cambiaron a solución de sacarosa 30% (Sigma, en PBS).

9.10.2. Preparación de las secciones

Después de que los cerebros en solución sacarosa 30% tocaban la base del envase, se cortaron usando un criostato (CM 1520; Leica) a -20°C , las rebanadas de $50\ \mu\text{m}$, se colectaron en cajas de cultivo de 24 o 12 pozos con anticongelante (40% glicerol, J. T. Baker; 10% etilén glicol, J. T. Baker; en PBS) y permanecieron guardadas a -20°C hasta su uso.

9.10.3. Inmunohistoquímica

Para evaluar actividad neuronal y número de neuronas nuevas, se cuantifico el número de neuronas positivas a c-Fos (Murphy *et al.*, 1991) y doblecortina (DCX) (Brown *et al.*, 2003).

Las rebanadas fueron colocadas en laminillas gelatinizadas (0.1% de Sulfato de Cromo (III) Potasio, Sigma; 1% Gelatina comercial Knox) y se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente las laminillas con el tejido ya seco y adherido se sumergieron durante 30 minutos en paraformaldehído 4%, posteriormente las preparaciones se enjuagaron con PBS. A continuación, las preparaciones pasaron por un gradiente de alcoholes: alcohol al 75%, después alcohol 1 100%, posteriormente alcohol 2 100 (J. T. Baker) y finalmente Xileno (100%, J. T. Baker). El siguiente paso fue pasar por el gradiente de regreso. Al terminar, las preparaciones se enjuagaron usando PBS. Este proceso permite que la gelatina se vuelva insoluble y se adhiera perfectamente al vidrio.

Recuperación de antígeno. Inmediatamente después se realizó la recuperación de antígeno. Esto consistía en colocar las preparaciones en una

solución de Buffer de citratos (0.01 M, 0.5 % Tween, pH 6 ajustado con NaOH, Sigma) y someterlas a una olla de presión para desdoblar las proteínas y exponer el lugar de unión del anticuerpo primario. Al terminar, se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBS.

Bloqueos. Después de la recuperación de antígeno, se bloquearon las peroxidasas endógenas usando una solución de Peróxido 3% (10% de Peróxido de hidrógeno a 30 % en PBS Sigma). Concluido el bloqueo se lavó el tejido con TBS-T (0.1M, 0.05% Tween, pH 7.4, Sigma). Después de los lavados el tejido fue desprendido de las laminillas con ayuda de una navaja y colocado en cajas de cultivo de 12 pozos, en ellos se llevó a cabo el bloqueo de proteínas (1% Albúmina de Suero Bovina (BSA), santa Cruz Biotechnology; 1% Suero Normal de Cabra NGS, Jackson, en TBS-T). El bloqueo de proteínas se dejó en agitación a 120 rpm (revoluciones por minuto) durante 1 hora.

Anticuerpo primario. Pasado el tiempo de bloqueo se colocó el anticuerpo primario contra c-Fos o DCX, según fuera el caso. Para c-Fos la concentración usada fue 1:2500: Anti-c-Fos (Ab-5) (4-17) Policlonal de conejo. No. De Catálogo PC38-1000 UL (Marca MILLIPORE/CALBIOCHEM). Por otro lado para Doblecortina la concentración fue de 1:5000: monoclonal en conejo, #4604S 100 UL (Marca Cell Signaling Technology). El anticuerpo se preparaba en una solución 1:2 de Bloqueo de Proteínas y TBS-T 1X. Se dejó incubando en anticuerpo primario durante 48 hrs a 120 rpm.

Lavados anticuerpo primario. El segundo día de Inmunohistoquímica se retiró el anticuerpo primario y se hicieron 6 lavados de 10 minutos con TBS-T 1X. Después se colocó el anticuerpo secundario; Anti IgG de Conejo, IgG acoplado a Biotina-SP-AffiniPure (H+L), presentación de 1.5 mL, JACKSON IMMUNORESEARCH, No. De catálogo 111-065-144-, a una concentración de 1:1000 en una solución 1:2 de bloqueo de proteínas y TBS-T 1. Se incubó durante 1 hora a 120 rpm.

Complejo Adivina-Biotina (ABC). Al concluir la hora de incubación del anticuerpo secundario, se hicieron 6 lavados de 10 minutos con TBS-T 1X, al tercer lavado se preparó el complejo ABC; kit ABC-peroxidasa Elite VECTASAN® No. De catálogo PK-6100. Y se dejó agitando a 120 rpm hasta su uso. Posterior a los 6 lavados el complejo ABC fue colocado en los tejidos y se dejó 1 hora a 120 rpm. Después se realizaron 6 lavados más con TBS-T.

Revelado. Tras el último lavado, se colocaron las rebanas en pozos limpios y se colocó 1 mL de solución de trabajo DAB-Ni (1:60 Ni, 1:60 DAB, 1:4000 H₂O₂ en TBS-T) en los pozos. La solución de trabajo se preparaba tras el penúltimo lavada antes de revelar. Primero se colocaba TBS-T 1X, se vertía el Ni (25 mg/mL, Sigma), posteriormente el DAB (20mg/mL, Sigma), se agitaba la solución con ayuda de un vórtex, después se aforaba con TBS-T y por último se añadió el peróxido 1:4000 (30%, J. T. Baker). La reacción fue monitoreada a partir de los 5 minutos, se colocaba una rebanada en una laminilla gelatinizada y se observaba en el microscopio. Después de tener una buena señal la reacción se detenía usando TBS-T. Para finalizar, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T, y permanecieron en TBS-T hasta ser montadas en laminillas.

9.10.4. Contratinción

Después del revelado, las rebanadas fueron colocadas en laminillas gelatinizadas para realizar la contratinción del tejido. Éstas se dejaban secar el tiempo que fuera necesario para que se adhirieran al vidrio.

Las preparaciones ya secas, fueron colocadas en una caja coplin con Verde de Metilo 1% (p.H. 4.2 ajustado con Buffer de Acetatos 0.1M, J. T. Baker) durante 20 minutos a 120 rpm. Pasado el tiempo, se enjuagaba con agua destilada. Después fueron colocadas en alcohol al 95%, seguido de alcohol 1 100%, luego a alcohol 2 100% y por último a Xileno 100%. Para finalizar se vertió Permout (Fisher) en las preparaciones y se les colocó un cubreobjetos.

9.10.5. Análisis de datos

Para DCX, se contaron a mano las neuronas positivas a DCX del giro dentado. Las secciones se observaban en el microscopio (Nikon Eclipse) y se realizó el conteo con el objetivo de 40X (N.A. 0.75). Se tomaron fotos con el programa QCapturePro4 (7.05 v), de toda la rebanada usando el objetivo 1X (N.A. 0.04) y se midió el área total del Giro Dentado del Hipocampo, con ayuda del programa ImageJ (1.48v). Se obtuvo el número de +DCX por mm^2 , usando la ecuación 1 (Figura 15).

Para el conteo de c-Fos, se tomaron fotografías en el microscopio con el objetivo 10X (N.A 0.30) de las áreas de interés (Giro dentado, CA3, CA1, amígdala basolateral, amígdala central, corteza prelímbica, corteza infralímbica y habénula), con ayuda del programa ImageJ se realizó el conteo automatizado de las células

positivas a c-Fos. Se tomaron como parámetros; 25-250 μm de circunferencia y 0.6-1 de circularidad. Posteriormente se midió el área de cada estructura y se obtuvo el número de células c-Fos + por μm^2 (Figura 15).

La ecuación 1 para obtener el número de células (Figura 15), fue utilizada para tomar en cuenta el tamaño del área para cada foto, de una misma estructura. Después de obtener el número de células c-Fos+ o +DCX, se calculaba el área y la densidad de células por cada foto de una sola rata. El siguiente paso fue sumar todas las áreas de esa estructura por rata, así se obtuvo el área total. Posteriormente se multiplicó cada área y la densidad de células, y el producto se dividió entre el área total. Por último se sumaron todos los cocientes obtenidos. Posterior al conteo de células, se realizaron gráficas usando el programa GraphPad Prism® (6.01 v) y para analizar si existían diferencias significativas entre grupos, se realizaron pruebas estadísticas usando Statistica64© (10 v).

$$\sum \frac{[(A_{i=1}^n)(d_{i=1}^n)]}{A_T}$$

Figura 15 Ecuación 1; Medias ponderadas para cuantificar c-Fos y DCX. Ecuación utilizada para obtener el número de células positivas a c-Fos o DCX tomando en cuenta el área de cada estructura de dónde se tomó la foto. **A** representa cada una de las áreas calculadas para cada foto de una sola estructura para cada rata (**A₁, A₂, A₃ ... A_n**). **A_T** representa el área total, siendo la suma de todas las áreas de una estructura. **d**

Posterior a obtener las medias ponderadas, se normalizaron los conteos solo para c-Fos utilizando la Ecuación 2 (Figura 16), en dónde se toma en cuenta la media y la varianza de los dos grupos (control; μ_C e irradiado; μ_R). Si el valor obtenido es positivo, significa que el grupo radiado está por encima del control, por otro lado, si el valor es negativo el grupo radiado se encuentra por debajo del grupo control. Asimismo, se puede observar si es significativa la diferencia si el valor es mayor a 1.8, ya sea positivo o negativo.

Para analizar la conducta de los animales se utilizaron varias pruebas estadísticas como, ANOVA de dos vías de medidas repetidas, t de Sstudent, y correlaciones lineales. El tipo de prueba estadística que se usó está especificada en cada figura.

$$Z = \frac{\mu_C - \mu_R}{\sqrt{\frac{\sigma^2}{\mu_C} + \frac{\sigma^2}{\mu_R}}}$$

Figura 16. Ecuación 2; Puntuación Z. Ecuación utilizada para normalizar los conteos de c-Fos de las estructuras analizadas. En donde μ es el promedio de todos los animales y σ^2 es la varianza.

10. Resultados

10.1. La ablación de la neurogénesis después de la extinción incrementa el regreso del miedo modificando circuitos hipocampales, corticales y de la habénula lateral.

10.1.1. La IRR después de la extinción incrementa el regreso del miedo.

El experimento Post-Extinción, consistió en evaluar si la disminución de neurogénesis por IRR (IRR), causaba algún efecto en la recuperación espontánea del miedo. Para ello se implementó un protocolo conductual en el cual las ratas asociaran un lugar con un evento aversivo, para así generar una memoria de miedo a este contexto. Posteriormente inhibieron su miedo a través de la extinción y se evaluó el regreso del miedo por medio de una prueba.

Para comenzar, se realizó el entrenamiento de palanqueo; una vez que las ratas concluían exitosamente el entrenamiento (12-15 palanqueos/minuto), daba inicio el condicionamiento (CND). Para ello las ratas fueron colocadas en las cajas de condicionamiento (EC) en donde se les dieron 5 choques eléctricos de 1 mA durante 2 segundos en las patas (EI). Estos choques sucedían de manera aleatoria para que las ratas no pudieran predecirlo. El CND duró 15 minutos, y los choques comenzaban a los 5 minutos, durante todo este tiempo estuvo presente el ruido blanco. Se evaluó el porcentaje de inmovilización y el número de palanqueo por

minuto. Durante los primeros 5 minutos del condicionamiento las ratas palanqueaban de manera constante sin inmovilizarse. A partir del minuto 5, con la presentación del primer choque, las ratas comenzaron a inmovilizarse. El condicionamiento fue exitoso y la memoria de miedo fue adquirida; se corroboró que la inmovilización con respecto al tiempo fue incrementándose (ANOVA medidas repetidas $F_{2, 38} = 54.28$, $p < 0.0001$). Por otro lado, el palanqueo decreció con respecto al tiempo ($F_{2, 38} = 32.63$, $p < 0.0001$) al final del condicionamiento la cadencia de palanqueo se aproximó a 0. Asimismo no hubo diferencias entre grupos IRR y control (Inmovilización $F_{1, 19} = 0.1199$, $p < 0.7329$; Palanqueo $F_{1, 19} = 0.5844$, $p = 0.4540$) (Figura 15).

Al día siguiente del condicionamiento se realizó la extinción. Los animales fueron colocados en la misma caja de condicionamiento (estímulo condicionado, EC) durante 50 minutos, la única diferencia era que no se presentaba el choque eléctrico (estímulo incondicionado, EI). Al evitar la presencia del EI, los animales disminuyeron paulatinamente sus respuestas de miedo (Figura 15). Al paso del tiempo los animales aprendieron que este lugar ya no representaba peligro; demostrado por menor inmovilización y mayor cadencia de palanqueos. (Inmovilización: $F_{9, 171} = 5.393$, $p < 0.0001$; palanqueo: $F_{9, 171} = 24.06$, $p < 0.0001$). Como en el condicionamiento, aquí tampoco hubo diferencias entre grupos (inmovilización $F_{1, 19} = 0.0006$, $p = 0.9804$; Palanqueo $F_{1, 19} = 0.2300$, $p = 0.6370$).

Para saber si la extinción había sido exitosa y la memoria segura había sido adquirida, se llevó a cabo una prueba al día siguiente (PBA1). En esta prueba, los animales estuvieron durante 10 minutos en la caja de condicionamiento, sin

choques. La inmovilización era nula o muy baja y los animales palanqueaban normalmente sin mostrarse diferencias entre grupos (t de Student; Inmovilización $t_{19} = 0.2850$, $p = 0.7787$; Palanqueo $t_{19} = 0.7777$, $p = 0.4459$). Inmediatamente después de la prueba se les daba acceso libre a la comida y se colocaban en grupos de 2-3 ratas por caja.

Al siguiente día de la PBA1, los animales tuvieron su primera sesión de IRR. Tanto el grupo radiado como control, fueron anestesiados y colocados en la máscara que las inmovilizaba al momento de colocarlas en el estereotáxico. No obstante, únicamente las ratas que iban a ser radiadas eran la que pasaban por todo el protocolo. Se realizaron 3 sesiones de IRR X los días 4,6 y 8, se dejaron pasar 30 días en donde tuvieron acceso libre a agua y comida.

El día 31 se privaron nuevamente de alimento, para que las ratas estuvieran motivadas el día de la prueba de recuperación espontánea (PBA2). El día 38 se llevó a cabo la PBA2. Los animales IRR mostraron no sólo recuperación espontánea, si no que esta fue mayor de lo esperado. Los animales IRR mostraron niveles altos de inmovilización ($t_{19} = 3.415$, $p < 0.0029$) y menores cadencias de palanqueo que los animales control ($t_{19} = 3.457$ $p < 0.0026$) (Figura 17).

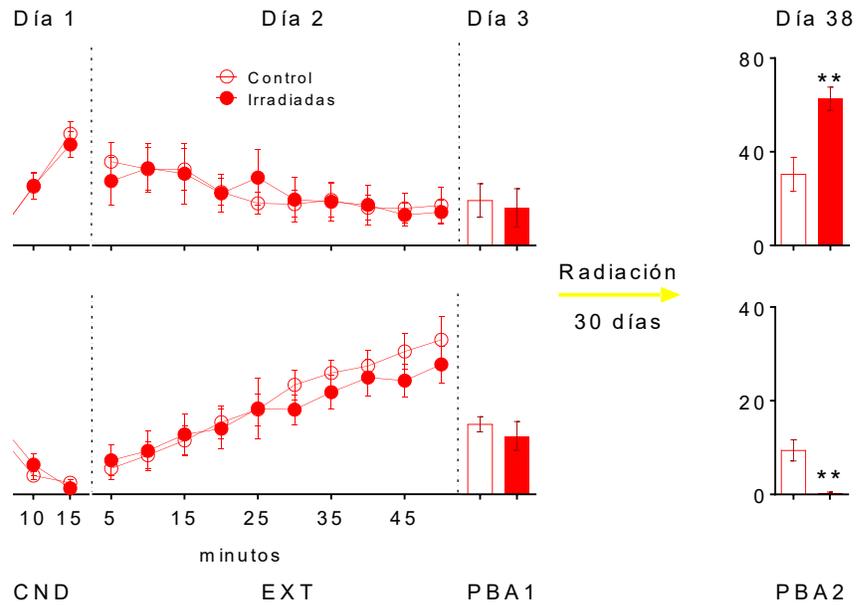


Figura 17. La IRR X después de la extinción, incrementa el regreso del miedo. Se muestra el cambio entre el % de inmovilización y el número de palanqueos por minuto, con respecto al tiempo. En el panel superior se encuentra graficado el % de inmovilización, y en el panel inferior se observa el número de palanqueos/minuto. El día 1 se realizó el CND, el día 2 la EXT y el día 3 la PBA1. Durante la PBA2 los animales IRR (n = 12) presentaron mayor miedo que los animales control (n = 9). ** p < 0.01.

10.1.2. Evaluación de la neurogénesis y actividad neural en el circuito de miedo.

Para evaluar si la IRR afecta la cantidad de neuronas nuevas en el hipocampo se inmunotizó DCX, que es una proteína asociada a microtúbulos. Los animales IRR muestran tres veces menos células inmunorreactivas a DCX que los controles ($t_{19} = 8.404$, $p < 0.0001$) lo que muestra el éxito de protocolo de ablación de neurogénesis (Figura 16 A y D).

Además de cuantificar en número de células inmunorreactivas a DCX, se hicieron correlaciones lineales con la conducta de la PBA2, y se detectó una relación

significativa entre los niveles de neurogénesis y la expresión del miedo (inmovilización: $R = -0.4864$, $p = 0.0253$; palanqueo $R = 0.4777$, $p = 0.0285$). Esto quiere decir que entre menor número de células +DCX la inmovilización es mayor, por el contrario, si tenemos mayor células +DCX hay menor inmovilización (Figura 18 B y C).

Sabiendo que la IRR funcionó como método de ablación de la neurogénesis, se llevó a cabo el conteo de células inmunorreactivas al gen de expresión temprana c-Fos. Las estructuras que fueron evaluadas para saber si participaban en el regreso del miedo fueron; el hipocampo (GD, CA3 y CA1), la amígdala (ABL y Ce), la corteza prefrontal medial (PL e IL) y la habénula lateral.

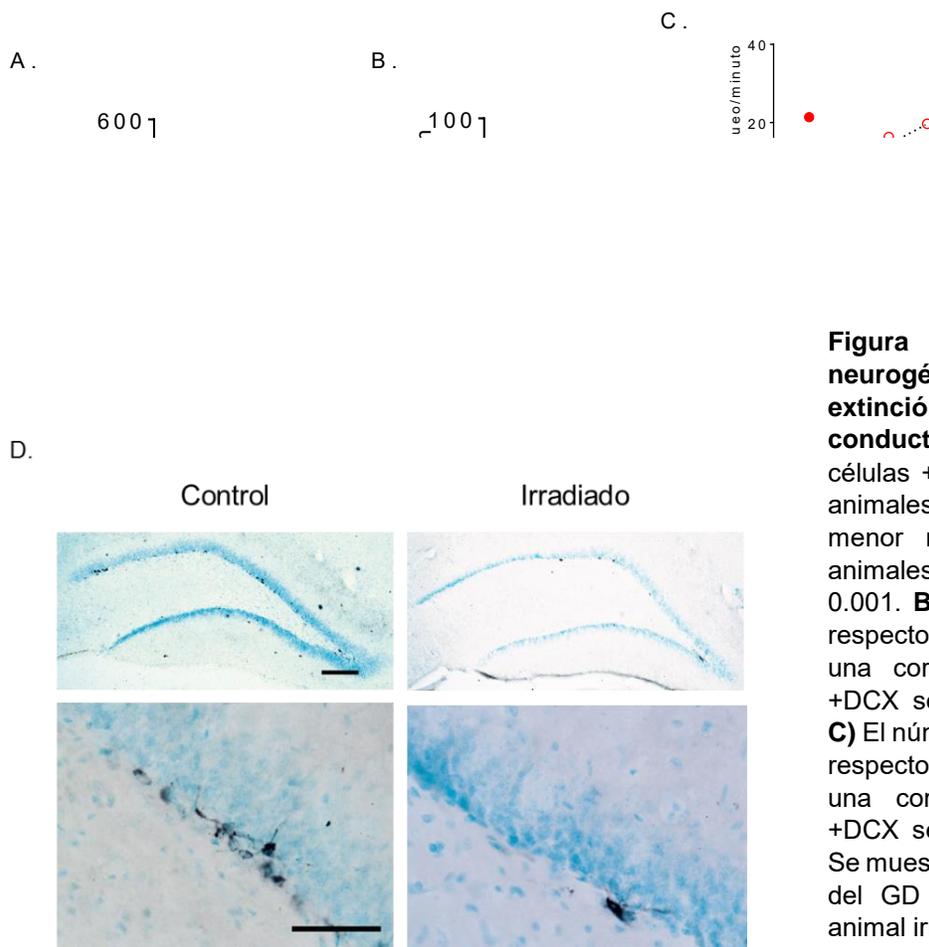


Figura 18. Disminuir la neurogénesis después de la extinción, tiene un efecto en la conducta. A) Se muestra el número de células +DCX/sección por grupos; los animales IRR (R ; $n = 9$) muestran menor número de +DCX que los animales control (C ; $n = 12$). $***p < 0.001$. **B)** El % de inmovilización con respecto al número de +DCX, muestra una correlación negativa; a menor +DCX se tiene mayor inmovilización. **C)** El número de palanqueo/minuto con respecto al número de +DCX muestra una correlación positiva, a menor +DCX se tiene menor palanqueo. **D)** Se muestran imágenes representativas del GD de un animal control y un animal irradiado.

En la capa CA3 del hipocampo, se observó que los animales IRR muestran menor actividad neural ($t_{15} = 4.220$, $p = 0.0007$) (Figura 17 A.). En las otras dos regiones del hipocampo no se encontraron diferencias entre IRR y controles; tanto el GD ($t_{15} = 0.8389$, $p = 0.4147$) como CA1 ($t_{15} = 0.9630$, $p = 0.3508$) (Figura 19 B y C). Estos resultados sugieren que las neuronas nuevas pueden estar interactuando

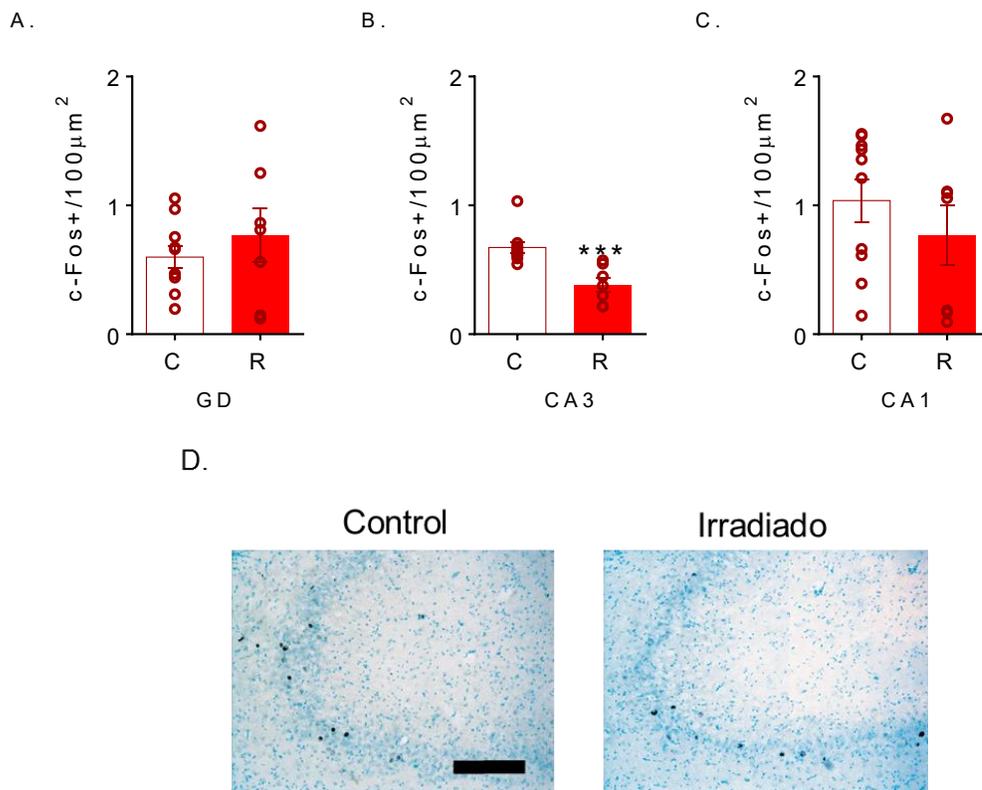


Figura 19. Disminuir la neurogénesis después de la extinción, disminuye la actividad en CA. La figura muestra el número de células c-Fos+ en las tres regiones del Hipocampo; GD, CA3 y CA1. **A)** El GD no muestra ninguna diferencia en la actividad neuronal entre grupos. **B)** Los animales IRR (n=7) muestran menor actividad en comparación con los animales control (n=10). *** $p < 0.001$. **C)** En CA1 no se encontraron diferencias entre los animales IRR y control. **D)** Imágenes representativas de CA3 de un animal control en contraste con un animal irradiado.

con las piramidales de CA3 y de alguna manera esta zona del hipocampo tienen un papel importante durante la conducta observada.

Las siguientes estructuras que se analizaron fueron las cortezas PL y la IL. A pesar de que la PL está relacionada con la expresión del miedo, no se encontraron cambios de activación entre animales IRR y controles ($t_{16} = 0.0972$, $p = 0.9238$) (Figura 20 A). De manera opuesta, la IL que se ha visto implicada con la inhibición del miedo, presentó menor actividad en los animales IRR en comparación con los animales control ($t_{16} = 2.154$, $p = 0.0468$) (Figura 20 B).

Este resultado sugiere que ambos grupos expresan miedo dado los conteos en PL, no obstante; parece ser que la actividad de la IL en los animales IRR es la que promueve que el miedo regrese.

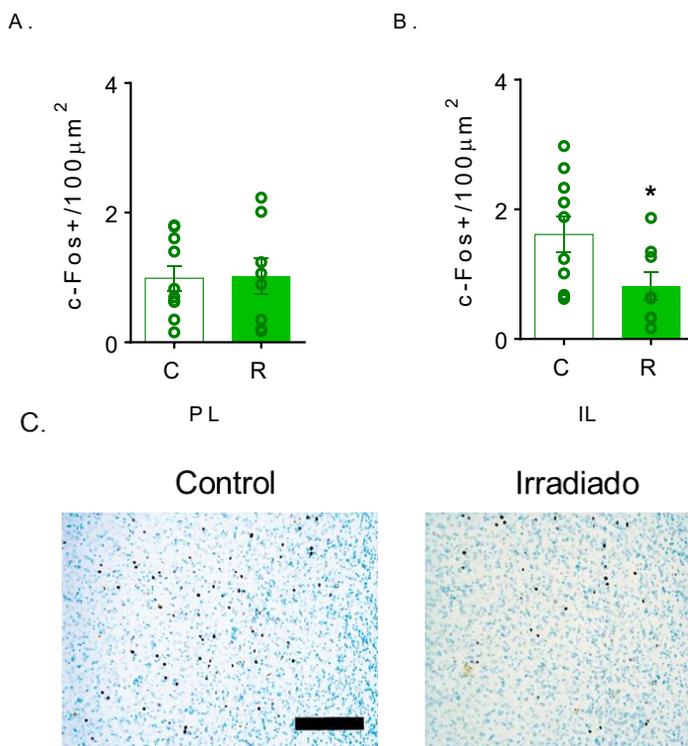


Figura 20. Disminuir la neurogénesis después de la extinción, disminuye la actividad de la IL. Se observa el número de células c-Fos+ en la CPFm; PL e IL. **A)** La corteza PL no presenta diferencias significativas entre el grupo radiado (n=8) y control (n=10). **B)** Los animales IRR presentan menor actividad neuronal, en comparación a los controles, en la corteza IL. * $p < 0.05$. **D)** Imágenes representativas de IL de un animal control en contraste con un animal irradiado.

Otra estructura importante en la expresión de la memoria de miedo es la amígdala. Dentro de esta estructura se analizaron los cambios en la expresión de c-Fos+ en la ABL y ACE (Figura 21 A y B) inesperadamente no mostraron diferencias entre grupos (ABL; $t_{14} = 0.3649$, $p = 0.7206$, ACE; $t_{13} = 1.192$, $p = 0.2546$). Este resultado sugiere que la amígdala no es la estructura que está modulando la conducta observada. Sin embargo, es importante recordar que es una región implicada en la evocación de la memoria de miedo, esto explicaría porque no hay diferencias entre grupos.

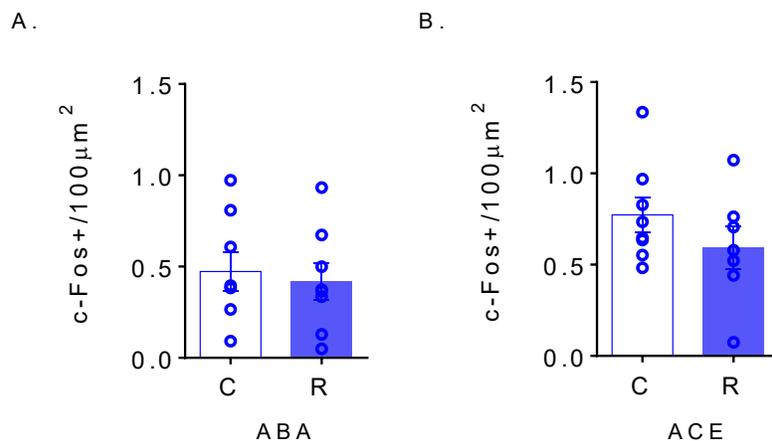


Figura 21. Disminuir la neurogénesis después de la extinción, no tiene efecto en la Amígdala. Se muestra el número de células c-Fos+ en la ABA y CeA. **A)** Tanto los animales IRR (n=8) como los animales control (n=8), tienen una cantidad similar en el número de células c-Fos+, en la ABA. **B)** La gráfica muestra que no se encontraron diferencias entre grupos en la

La habénula lateral (Figura 22) una estructura que participa cuando existen señales aversivas, presentó mayor número de células c-Fos+ en los animales IRR

($t_{14} = 2.214$, $p = 0.0440$) en contraste con los animales control. Lo que podría significar que esta estructura tiene un papel importante en las conductas de miedo.

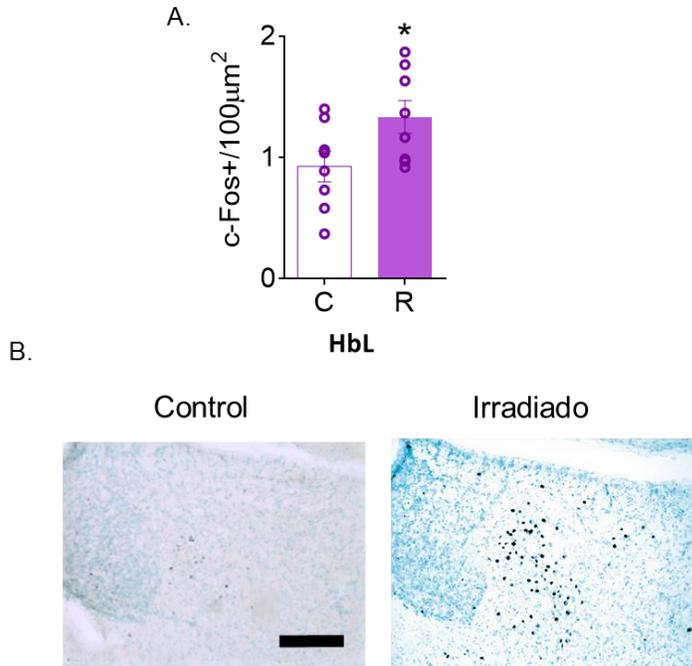
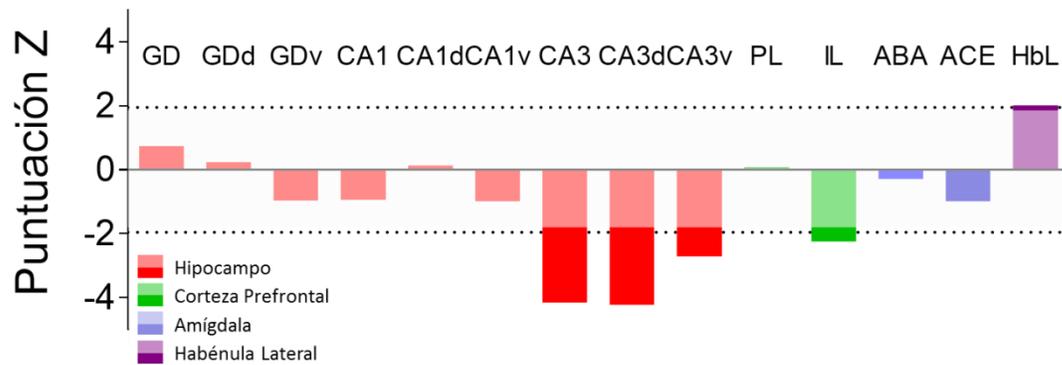


Figura 22. Disminuir la neurogénesis aumenta la actividad de la Hbl. A) Se muestra el número de células c-Fos+ en la Hbl. En donde los animales IRR ($n = 8$) presentan mayor número de células c-Fos que en los controles ($n = 8$). **B)** Imágenes representativas de expresión de c-Fos de un animal control in un animal IRR. * $p < 0.05$.

Para visualizar de mejor manera las diferencias encontradas en c-Fos, y así comparar los resultados encontrados en cada área; se normalizaron los datos utilizando la ecuación 2. En la Figura 23, se muestran los datos analizados por estructuras y haciendo distinción entre áreas de cada una de ellas. Los colores indican las diferentes estructuras, y el área sombreada revela si ésta zona es o no significativa (mayor a 1.96). Además, si el valor es positivo, indica que los animales IRR presentan mayor cantidad de células c-Fos+, que el control. Por otro lado, si el

valor es negativo, implica que los animales IRR presentaron menor número de células c-Fos+ con respecto al control.



10.2. La ablación de la neurogénesis *antes* de la extinción no tiene efecto sobre el regreso del miedo.

10.2.1. La IRR previa a la extinción no altera el regreso del miedo.

Para determinar si el efecto encontrado en la conducta del experimento Post-Extinción, era dependiente del momento en el que se realizaba la manipulación de la neurogénesis. Se realizó un experimento en dónde la manipulación se llevó a cabo antes de la extinción.

El experimento Pre-Extinción fue diseñado exactamente igual que el primer experimento. Los animales fueron entrenados a palanquear por comida antes de

someterse al CND. Durante la adquisición de la memoria de miedo, los parámetros del choque eléctrico, el tiempo y el contexto, fueron los mismos que en el primer experimento. Después del CND los días 2, 4 y 6, los animales fueron irradiados; posteriormente pasaron 30 días en su caja-hogar con acceso libre a agua y alimento, y el día 31 fueron privados de alimento nuevamente. Para ser consistentes con el número de pruebas y los días en los que se llevó a cabo la PBA2; el día 36 las ratas fueron sometidas a la EXT, el día 37 la PBA1 y finalmente el día 38 la PBA2. Pasados 90 minutos los animales fueron sacrificados para utilizar los cerebros en Inmunohistoquímica.

El día 1 (Figura 22) del experimento los animales condicionaron exitosamente, siendo la inmovilización ($F_{2, 22} = 108.6$, $p < 0.0001$) y el palanqueo ($F_{2, 22} = 85.39$, $p < 0.0001$) significativos con respecto al tiempo, mostrando que la memoria de miedo había sido adquirida. Asimismo no hubo diferencias significativas entre grupos (Inmovilización $F_{1, 11} = 0.0087$, $p = 0.9271$; Palanqueo $F_{1, 11} = 1.248$, $p = 0.2877$). Posterior a la IRR, se realizó la EXT el día 36, los animales mostraron una exitosa disminución del miedo, siendo la inmovilización menor con respecto al tiempo ($F_{9, 99} = 4.080$, $p = 0.0002$) y el palanqueo ($F_{9, 99} = 7.884$, $p < 0.0001$) aumentaba con respecto al tiempo. Asimismo no se encontraron diferencias entre grupos (Inmovilización $F_{1, 11} = 0.1145$, $p = 0.7415$; Palanqueo $F_{1, 11} = 0.5376$, $p = 0.4788$). Al siguiente día se realizó la PBA1, en donde tampoco hubo diferencias entre grupos (Inmovilización $t_{11} = 0.1134$, $p = 0.09117$; Palanqueo $t_{11} = 0.9197$, $p = 0.3774$). La PBA2, realizada el día 38, tampoco mostró diferencias entre grupos

(Inmovilización $t_{11} = 0.8820$, $p = 0.3966$; Palanqueo $t_{11} = 1.099$, $p = 0.2951$) (Figura 24).

Estos resultados muestran que si se disminuye la neurogénesis antes de llevar a cabo el entrenamiento de extinción, no se promueve la recuperación del miedo. Sugiriendo que es necesario que existan la memoria de extinción y condicionamiento antes de que se manipule la neurogénesis para que esta tenga efecto.

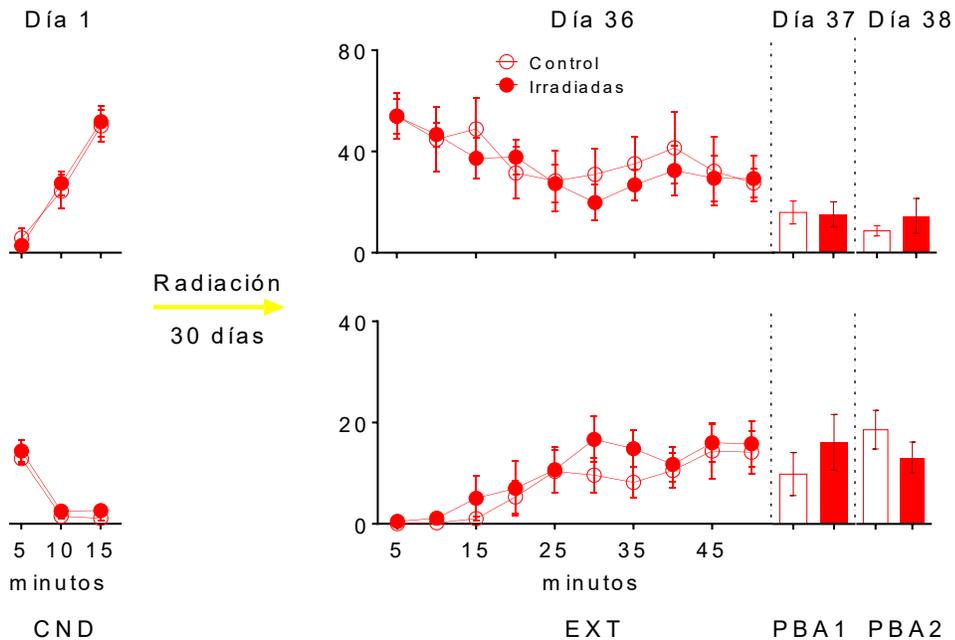


Figura 24. La IRR X antes de la extinción, no incrementa el regreso del miedo. Se muestra el cambio entre el % de inmovilización y el número de palanqueos por minuto, con respecto al tiempo. En el panel superior se encuentra graficado el % de inmovilización, y en el panel inferior se observa el número de palanqueos/minuto. El día 1 se realizó el CND, el día 36 la EXT y el día 37 la PBA1. Posterior al CND se realizó la IRR X, sin embargo durante la PBA2, tanto los animales IRR ($n=6$) como control ($n=7$) se comportaron igual.

10.2.2. La ablación de la neurogénesis no se relaciona con la expresión del miedo.

Para este experimento también se cuantificaron las células inmunorreactivas a DCX, para corroborar que la IRR había disminuido el número de neuronas nuevas en el giro dentado del hipocampo ($t_{11} = 4.829$, $p < 0.0005$) (Figura 25 A). Los niveles de inmovilización y ($R = 0.3187$, $p = 0.2884$) y la cadencia de palanqueo ($R = 0.3506$, $p = 0.2402$) (Figura 25 B y C) no mostraron correlación con el número de células +DCX.

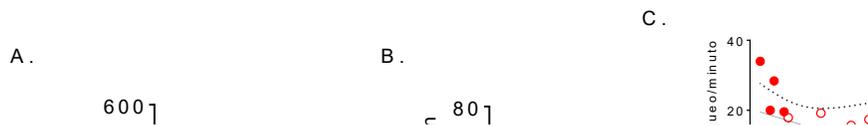


Figura 25. La IRR X antes de la extinción disminuye la neurogénesis, sin efecto en la conducta. A) Se observa que los animales IRR ($n=7$) presentan menor número de células +DCX con respecto a los animales control ($n=6$) $***p < 0.001$. **B)** En esta figura se observa que no existe correlación entre la neurogénesis y la inmovilización. **C)** Al igual que la inmovilización, el palanqueo tampoco muestra una correlación con la neurogénesis.

10.3. La ablación de la neurogénesis no afecta los niveles de miedo.

10.3.1. La IRR en ausencia de extinción no afecta los niveles de miedo.

Posterior a los dos experimentos en donde la manipulación de la neurogénesis cambiaba de temporalidad, nos preguntamos si la IRR sería suficiente para modificar los niveles de miedo observados en la PBA. Para ello se elaboró un experimento en donde los animales no aprendieron a extinguir su miedo.

El experimento No-Extinción presentaba el CND y las dos pruebas, sin embargo, no se realizó la EXT. Antes de iniciar el experimento, los animales aprendieron a presionar una palanca en busca de comida, como en los experimentos anteriores. El día 1 del experimento los animales fueron condicionados usando los mismos parámetros de intensidad y tiempo del choque eléctrico. Al siguiente día se realizó la PBA1, la cual correspondería a la prueba para corroborar que la extinción había sido exitosa. Al día siguiente las ratas recibieron su primera sesión de IRR X. Pasados los 30 días se privaron de alimento y el día 38 se llevó a cabo la PBA2.

El CND, como se observa en (Figura 26), fue exitoso. La inmovilización aumento ($F_{2, 24} = 42.33$, $p < 0.0001$) y la cadencia de palanqueo aumentó ($F_{2, 24} = 57.03$, $p < 0.0001$) con respecto al tiempo. Además se corroboró que no existían diferencias entre grupos (Inmovilización $F_{1, 12} = 0.0350$, $p = 0.8546$; Palanqueo $F_{1, 12} = 0.6583$, $p = 0.4336$). Al día siguiente se realizó la PBA1, en donde no se

encontraron diferencias entre grupos (Inmovilización $t_{12} = 0.0079$, $p = 0.9938$; Palanqueo $t_{12} = 0.2180$, $p = 0.8311$). Los días 3,5 y 7 las ratas fueron sometidas a IRR, pasados los 30 días se realizó la PBA2. En esta última prueba tampoco se encontraron diferencias entre grupos (Inmovilización $t_{12} = 0.0098$, $p = 0.9923$; Palanqueo $t_{12} = 0.3186$, $p = 0.7555$).

Los resultados encontrados en este experimento, sugieren que la IRR no promueve los niveles de miedo observados en el experimento Post-Extinción, por lo que el efecto observado en dicho experimento es dependiente de extinción. Este resultado indica que es necesaria la existencia de la memoria de condicionamiento y la de extinción para que la ablación de la neurogénesis tenga efecto.

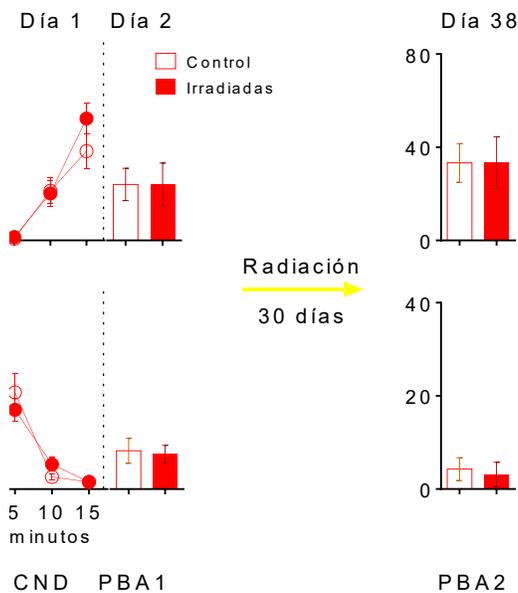
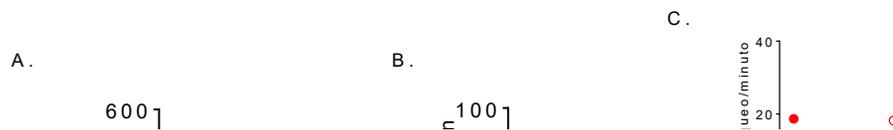


Figura 26. Si no existe extinción, la IRR no incrementa el regreso del miedo. Se muestra el cambio entre el % de inmovilización y el número de palanqueos por minuto, con respecto al tiempo. En el panel superior se encuentra graficado el % de inmovilización, y en el panel inferior se observa el número de palanqueos/minuto. El día 1 se realizó el CND, el día 2 la PBA1. Posterior a la PBA1 se realizó la IRR X, sin embargo durante la PBA2, tanto los animales IRR ($n = 7$) como control ($n = 7$) se comportaron igual, no se incrementó el miedo.

10.3.2. La ablación de la neurogénesis en ausencia de extinción, no correlaciona con la conducta.

Para corroborar que el efecto encontrado en este experimento es dependiente de la manipulación, los cerebros de los animales fueron inmunoteñidos para detección de DCX. Los animales IRR presentaron menor número de células +DCX ($t_{11} = 4.472$, $p = 0.0009$); comprobando que la IRR disminuyó la neurogénesis (Figura 25 A). Además de los conteos, se hicieron correlaciones entre el número de células +DCX y la conducta. Como se esperaba, la disminución de la neurogénesis no correlacionó con la conducta. La inmovilización no arrojó relación alguna ($R \approx 0$, $p = 0.9967$) ni el palanqueo ($R \approx 0$, $p = 0.8160$). Por lo que se concluye que los niveles de miedo observados en este experimento se comportan independientemente del número de nuevas neuronas (Figura 27 B y C). Este resultado implica que a pesar que la IRR fue exitosa, la ablación de la neurogénesis



no está afectando la conducta, comprobando que el efecto observado en el primer experimento es dependiente de extinción.

10.4. La ablación de neurogénesis en animales con neurogénesis incrementada, promueve el regreso del miedo.

10.4.1. La IRR en animales enriquecidos afecta el regreso del miedo.

Después de los resultados obtenidos con IRR, nos preguntamos si los resultados obtenidos en el primer experimento eran dependientes del menor número de neuronas nuevas. Para responder esta pregunta se utilizó el protocolo Post-Extinción, en el cual los animales no sólo fueron sometidos a IRR X, sino que estuvieron en un ambiente enriquecido con el fin de aumentar la neurogénesis.

Antes de comenzar los experimentos, los animales aprendieron a presionar una palanca para obtener comida. Después de este entrenamiento, las ratas fueron condicionadas. Tanto la inmovilización ($F_{2, 28} = 178.7$, $p < 0.0001$) como el palanqueo ($F_{2, 28} = 36.14$, $p < 0.0001$) se modificaron respecto al tiempo. Lo que mostró un condicionamiento exitoso sin que hubiese diferencias entre grupos (Inmovilización $F_{1, 14} = 4.495$, $p = 0.0524$; Palanqueo $F_{1, 14} = 0.0234$, $p = 0.8806$).

Al día siguiente los animales fueron sometidos al entrenamiento de extinción, en dónde no hubo diferencias entre grupos (Inmovilización $F_{1, 14} = 0.8559$, $p = 0.3706$; Palanqueo $F_{1, 14} = 2.271$, $p = 0.1540$). Asimismo, la extinción fue exitosa pues la inmovilización disminuyó ($F_{9, 126} = 5.122$, $p < 0.0001$) y el palanqueo aumento

($F_{9, 126} = 11.18$, $p < 0.0001$) con respecto al tiempo. Posteriormente se llevó a cabo la PBA1, mostrando que la extinción había sido exitosa y no había diferencia entre los grupos (Inmovilización $t_{14} = 1.259$, $p = 0.2286$, palanqueo $t_{14} = 0.4568$, $p = 0.6548$)

Después de la PBA1, los animales fueron IRR y todos ellos colocados en sus cajas-hogar con enriquecimiento ambiental. Recibieron dos sesiones más de IRRIRR los días 6 y 8, y pasaron durante 30 días en enriquecimiento ambiental (rueda para correr, túnel y material para roer). Utilizando este protocolo se esperaba que el enriquecimiento ambiental promoviera la neurogénesis de los animales control (no IRR), pero no de los animales IRRIRR. El día 38 se llevó a cabo la PBA2, los animales IRR mostraron mayor inmovilidad ($t_{14} = 2.789$, $p = 0.0145$) y poco palanqueo ($t_{14} = 2.203$, $p = 0.0448$) con respecto a los control. Por lo que el efecto de la IRRIRR no fue atenuado por el enriquecimiento ambiental (Figura 28).

Este resultado sugiere que el efecto en la conducta observada en la PBA2 es dependiente de la manipulación de la neurogénesis. Los animales enriquecidos-IRRIRR, a pesar de haber estado en ambiente enriquecido mostraron mayores niveles de miedo en comparación con los controles. Para confirmar que este resultado es dependiente de la neurogénesis, se contaron el número de células reactivas a DCX.

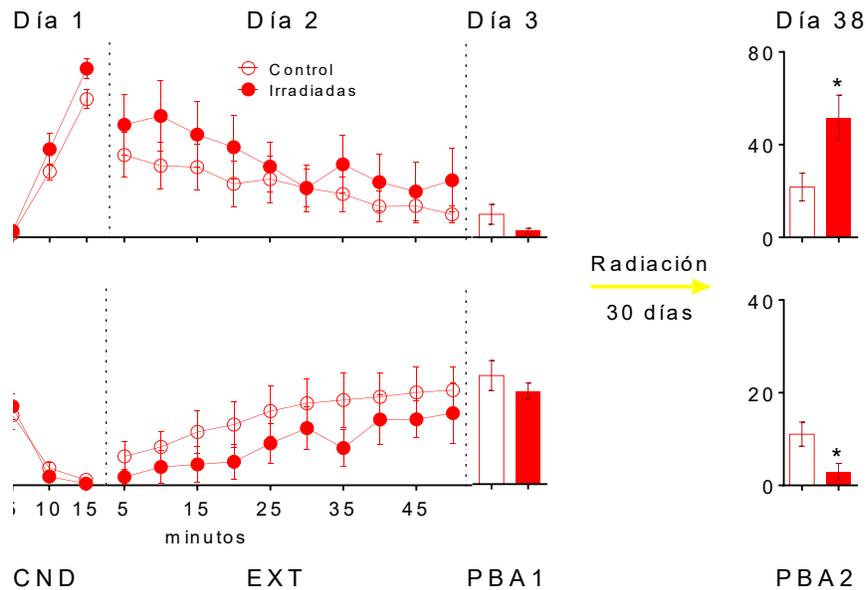


Figura 28. El enriquecimiento ambiental *no* revierte los efectos de la IRR X. Se muestra el cambio entre el % de inmovilización y el número de palanqueos por minuto, con respecto al tiempo. En el panel superior se encuentra graficado el % de inmovilización, y en el panel inferior se observa el número de palanqueos/minuto. El día 1 se realizó el CND, el día 2 la EXT y el día 3 la PBA1. Posterior a los 30 días se realizó la PBA2, los animales control (n=10) mostraron mayor inmovilización y menor palanqueo que los animales IRR (n = 6). *p < 0.05.

10.4.2. El aumento en el regreso del miedo es dependiente de la ablación de la neurogénesis.

El Análisis de células inmunorreactivas a DCX mostró una ablación substancial en los enriquecidos-IRRIRR frente a los controles, a pesar de que todos fueron enriquecidos ($t_{15} = 5.596$, $p = 0.0001$) (Figura 29 A), Por lo que el ambiente enriquecido no atenúo el efecto de la IRR, y este promovió el regreso del miedo.

Además de los conteos, se hicieron correlaciones entre el número de células +DCX y la conducta. La regresión lineal que se hizo mostró que sólo la inmovilización mostraba una correlación significativa ($R = 0.5781$, $p = 0.0190$). Por otro lado, el palanqueo no mostró estar correlacionado con la neurogénesis ($R = 0.3713$, $p = 0.1568$) (Figura 29 B y C).

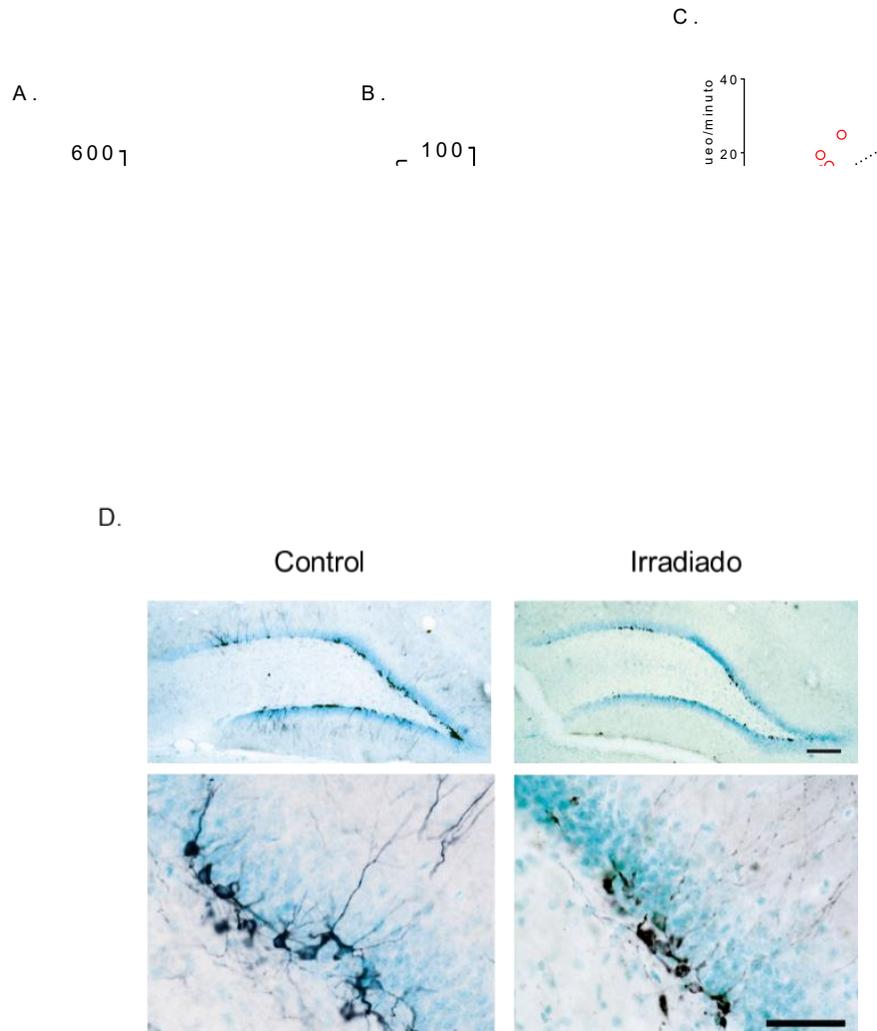


Figura 29. El aumento del regreso del miedo es dependiente de la ablación de la neurogénesis. A) Se muestra el número de células +DCX / 0.1 mm² por grupos; los animales IRR (R; n=7) muestran menor número de +DCX que los animales control (C; n = 10). * $p < 0.05$. **B)** El % de inmovilización con respecto al número de +DCX, muestra una correlación negativa. **C)** El número de palanqueo/minuto con respecto al número de +DCX no presenta una correlación.

Este resultado junto con el análisis de la conducta de los animales, sugieren que a pesar de que los animales estuvieron en ambiente enriquecido aumentando su neurogénesis (Figura 29 A y D); el efecto de la IRR en los animales enriquecidos-IRR (Figura 29 A y D) es exclusivo de la manipulación de la neurogénesis.

11. Discusión

El miedo es una respuesta necesaria para sobrevivir, sin embargo, cuando una situación deja de ser peligrosa, tener miedo ya no es necesario e incluso contraproducente. Usando el condicionamiento al miedo los animales, aprenden a tener miedo asociado a un estímulo condicionado (como el contexto utilizado en este trabajo). Asimismo, usando la extinción se aprende a inhibir el miedo asociado a dicho estímulo condicionado. Sin embargo, la memoria de miedo regresa a pesar de una exitosa extinción (Bouton, 2002). Se ha buscado una manera de evitar que el miedo regrese. Una de las opciones reside a nivel de modificar los circuitos cerebrales asociados a la extinción. El hipocampo, junto con otras estructuras, juega un papel importante en las memorias de miedo, encargándose de la representación contextual (Bouton, 2002; Matsumoto y Hikosaka, 2007; Orsini y Maren, 2012). Por lo tanto, en este trabajo nos enfocamos en manipular la actividad del hipocampo para evitar el regreso del miedo. En particular utilizamos manipulación de los niveles de neurogénesis hipocampales.

El hipocampo es una región cerebral que genera neuronas nuevas (neurogénesis) durante la vida adulta (Kaplan y Hinds, 1977). La neurogénesis y su papel en la memoria, ha arrojado resultados discordantes y difícilmente se puede establecer su rol en la memoria de miedo (Shors *et al.*, 2002b; Corcoran *et al.*, 2005; Snyder *et al.*, 2005). Sin embargo, algunos estudios han mostrado efecto en conductas de miedo en donde se lleva a cabo la extinción (Pan *et al.*, 2012), dando pie a pensar en una nueva posibilidad para evaluar la modulación de la neurogénesis en el regreso del miedo. Es por esta razón, que en este estudio se planteó si el hipocampo, a través de la neurogénesis, podía modular el regreso

del miedo. Se propuso remover las neuronas nuevas para evaluar si son necesarias, para ello se realizó la ablación de la neurogénesis usando irradiación X (IRR).

11.1. Irradiación como método eficaz de ablación de la neurogénesis.

Uno de los retos a superar en este proyecto era el protocolo de IRR. A pesar de que este método de ablación ha sido utilizado en un sin número de trabajos, la mayoría de estos no realizan una IRR específica (Rola *et al.*, 2004; Kitamura *et al.*, 2009; Ko *et al.*, 2009). Nuestro protocolo se basó en estudios en donde la IRR se realiza únicamente en el hipocampo; sin embargo, la dosis se deposita en las regiones por donde cruza el as de IRR (Kitamura *et al.*, 2009). Es por ello que nuestro protocolo basado en la técnica de arcos asegura que la dosis total de IRR (15 Gy) sea depositada únicamente en el hipocampo. La IRR tiene un efecto directo únicamente sobre las neuronas nuevas generando desacoplamiento en el DNA, por lo que deja a las neuronas maduras intactas (Wojtowicz, 2006). Esto pudimos confirmarlo observando los conteos de +DCX de todos los experimentos, en los cuales los animales irradiados presentan menos +DCX que sus controles. La dosis depositada mostró disminución en el número de neuronas nuevas. Este resultado fue consistente con los encontrados por otros investigadores (Kitamura *et al.*, 2009).

11.2. La ablación de la neurogénesis después de la extinción incrementa el regreso del miedo, reclutando actividad de circuitos hipocampales, corticales y de la habénula.

Puesto que la mayoría de los estudios que se han realizado al respecto, modulan la neurogénesis antes del aprendizaje encontrando efectos opuestos (Shors *et al.*, 2002b; Snyder *et al.*, 2005; Sierra-Mercado *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2008); el primer experimento que se realizó fue evaluar si existe un efecto de reducir la neurogénesis *después* de la extinción. Para ello se realizó un condicionamiento contextual dependiente de hipocampo. En este experimento, se observó que todos los animales condicionaron y extinguieron exitosamente. Para evaluar la recuperación espontánea, 30 días después, se realizó una prueba. En esta prueba se observó que los animales irradiados tuvieron mayor inmovilización y menor cadencia de palanqueo que los controles.

Estos resultados muestran un efecto claro de la ablación de la neurogénesis en el regreso del miedo; no sólo el miedo regresó si no que este fue mayor. Para corroborar que los resultados observados son causa de la neurogénesis, se realizó una inmunohistoquímica para detectar neuronas inmaduras usando el marcador DCX. Debido a que los animales control no fueron irradiados, sus niveles de neurogénesis fueron tres veces mayores que en los animales IRR. Teniendo estos resultados, lo siguiente fue hacer una correlación con la conducta y poder afirmar que nuestros resultados se deben al efecto de la neurogénesis. La regresión lineal mostró que tanto la inmovilización como el palanqueo correlacionan y parecen ser dependientes del número de neuronas inmaduras.

Sin embargo, aunque establecimos un posible efecto causal entre la neurogénesis y la conducta, no sabíamos cómo se estaban comportando las regiones cerebrales involucradas en la expresión del miedo. Para ello llevamos a cabo inmunohistoquímica contra c-Fos, para evaluar la actividad neuronal, así logramos observar que regiones cerebrales estaban activas durante la prueba de regreso del miedo. Una de las regiones primordiales a examinar fue la amígdala. Esta es la encargada de realizar la asociación

entre en EC-EI y dar una respuesta y es por excelencia la estructura del miedo. Sin embargo, tanto la ABL como la ACE no mostraron diferencias entre animales controles e irradiados. Se sabe que el papel de la amígdala durante el condicionamiento es recopilar la información proveniente del hipocampo y otras regiones corticales para dar una respuesta de miedo (Maren, 2001). De igual manera, es en la extinción en donde la amígdala requiere de la ayuda de la CPFm para poder aprender que el EC ya no predice peligro (Sotres-Bayon *et al.*, 2006). En los resultados que nosotros encontramos, la amígdala en ambos grupos está activada, lo que quiere decir que hay miedo, congruente con los resultados conductuales. No obstante, quien modula el nivel de miedo no es la amígdala, sino la CPFm (Sotres-Bayon y Quirk, 2010). Por esta razón es posible que la amígdala no presente diferencias entre grupos.

La CPFm recibe proyecciones no sólo de la amígdala, sino también del hipocampo, por lo que es una estructura que integra información necesaria para saber si es necesario tener miedo. En los resultados que nosotros obtuvimos únicamente observamos diferencias en la IL, no así en la PL. Se sabe que la PL está involucrada en la expresión del miedo condicionado pero no el innato (Corcoran y Quirk, 2007), por lo que siempre que exista miedo condicionado esta se va a activar. Mientras que la IL está implicada en la inhibición del miedo (Sierra-Mercado *et al.*, 2006; Sierra-Mercado *et al.*, 2011). En la prueba de recuperación del miedo (PBA2) de nuestro experimento, observamos que ambos grupos tienen miedo, por lo que es congruente pensar que en ambos grupos hubiese actividad de la PL. Por otro lado, se ha visto que la IL tiene una mayor participación que la PL, cuando el EC se presenta en el mismo lugar de extinción (como se realizó en nuestro protocolo) (Knapska y Maren, 2009). Durante la PBA2 se observa que la IL en los controles es mayor,

los cuales mostraron mayores niveles de miedo. Este resultado sugiere que la actividad de la IL podría tener un papel importante en nuestra conducta.

Aunque la amígdala y la CPFm son estructuras involucradas en la expresión del miedo, no son las únicas que se activan en el condicionamiento y la extinción. Recordemos que la recuperación espontánea es un fenómeno de la extinción en donde el miedo regresa con el simple paso del tiempo. Este “paso del tiempo” provee una señal contextual, por lo que cuando el EC se asocia con un contexto temporal, al salirse de este espacio el miedo regresa. En otras palabras, este fenómeno de regreso del miedo, los mecanismos que deberían regular la temporalidad de la extinción y permitir inhibir el miedo, están alterados (Ji y Maren, 2007). El hipocampo es el encargado de esta parte contextual, es por ello que se cuantificaron los núcleos inmunorreactivos a c-Fos en el GD, CA3 y CA1. Varios estudios en donde se inactiva el hipocampo dorsal y ventral han mostrado que CA1 y el GD muestran niveles altos de activación visualizada con c-Fos durante la prueba de extinción, mostrando la participación de estas estructuras en la evaluación de pistas contextuales (Knapska y Maren, 2009). En este trabajo se encontraron diferencias sólo en CA3, siendo los animales irradiados los que presentan menor cantidad de expresión de neuronas activadas. Por otro lado CA1 y el GD no presentaron diferencias significativas. Las neuronas nuevas del GD se conectan con las neuronas piramidales de CA3 y se ha observado que estas nuevas conexiones son capaces de remover sinapsis viejas, siendo estas totalmente funcionales (Toni *et al.*, 2007; Akers *et al.*, 2014). A pesar que no se sabe el mecanismo exacto de como sucede esto, nuestros resultados muestran evidencia de que el posible re-arreglo sináptico de CA3 podría estar modulando la expresión del miedo a través de sus conexiones con otras estructuras como el *subículum* y CA1, que a su vez se conectan con la CPFm y la Amígdala (Jin y Maren, 2015) (Figura 29).

La Hbl es una estructura conservada presente en la mayoría de los vertebrados. Es una región que ha sido involucrada en varias expresiones conductuales, como el estrés, ansiedad, dolor y recompensa (Hikosaka, 2010). Su rol en el miedo ha sido poco estudiado, sin embargo, se ha observado que lesionando la Hbl el condicionamiento contextual se ve afectado. Estos animales no condicionan, expresando poca inmovilización (Wang *et al.*, 2013). Reafirmando estos resultados, nosotros encontramos que los animales irradiados (miedo alto en la prueba) muestran mayor actividad en la Hbl que los controles. Lo cual podría sugerir que la Hbl participa en la expresión del miedo. Asimismo, en años recientes un estudio en donde usaron trazadores retrógrados, observaron que la CPFm tiene conexiones hacia la Hbl (Kim y Lee, 2012); por lo que el papel de la Hbl en este experimento podría estar relacionado con la actividad de la PL e IL, como sugieren nuestros resultados (Figura 29).

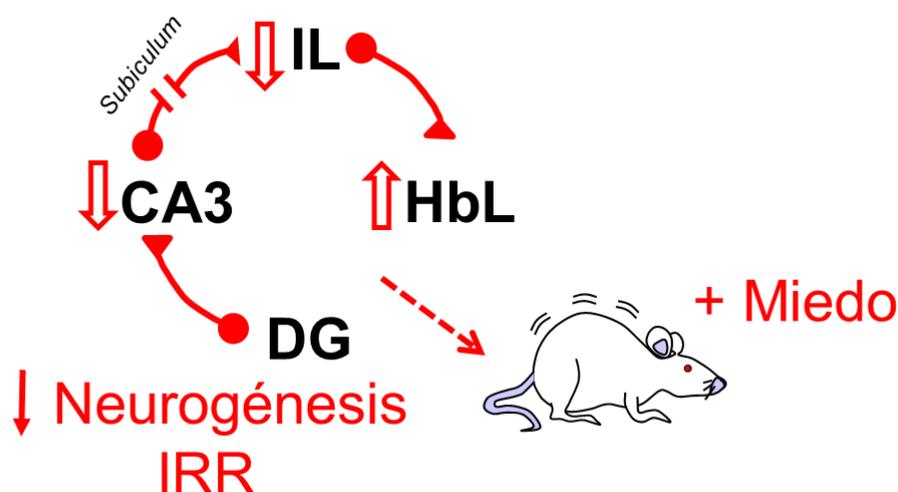


Figura 29. Menor neurogénesis promueve el regreso del miedo. Se propone el circuito de miedo modulado a través de la neurogénesis del GD. Se sugiere que las modificaciones de GD afectan la actividad de CA3, estas a su vez por medio del *subículum* mando información a la corteza IL, que disminuye su actividad. Asimismo la corteza IL manda información a la Hbl que aumenta su actividad neuronal. La actividad en conjunto de todas estas estructuras promueve el regreso del miedo.

11.3. La ablación de la neurogénesis antes de la extinción no

Debido a que las investigaciones sobre extinción que se han hecho manipulando los niveles de neurogénesis son inconsistentes (Shors *et al.*, 2002b; Winocur *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2012; Besnard y Sahay, 2016); decidimos explorar si la ablación de la neurogénesis tiene efecto si esta se realiza antes de la extinción. Realizamos el mismo protocolo pero la extinción se llevó a cabo a los 30 días y la IRR se realizó tras el condicionamiento. Durante la prueba de recuperación espontánea no observamos diferencias entre grupos, similar a otros estudios realizados por otros investigadores (Ko *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2012). Por otro lado, realizando una regresión lineal entre la conducta y el número de +DCX, no se encontró ninguna correlación. Este resultado sugiere que es necesario que exista la memoria de condicionamiento y la de extinción para que la neurogénesis tenga efecto, como se ha observado en otros trabajos en donde la manipulación es después del aprendizaje (Akers *et al.*, 2014).

11.4. La ablación de la neurogénesis en ausencia de extinción no afecta los niveles de miedo.

Asimismo decidimos explorar si en ausencia de extinción se observaba algún efecto en los niveles de miedo. Realizando el mismo protocolo pero esta vez la extinción no se llevó a cabo, durante la prueba 2 no hubo diferencias entre grupos y el miedo se mantuvo en los niveles de condicionamiento. Puesto que la recuperación espontánea es un fenómeno que sucede cuando existe extinción, aquí no observaríamos recuperación espontánea (Maren, 2014). El miedo se mantuvo en sus niveles de condicionamiento

puesto que jamás hubo inhibición de este; no obstante, este resultado muestra que la IRR no promueve el aumento de los niveles de miedo. Observando la regresión lineal de la conducta y el número de células inmaduras confirmamos que no existe correlación entre la neurogénesis y el miedo. Este resultado sugiere que la neurogénesis en conjunto con la extinción modula el regreso del miedo.

11.5. La ablación de neurogénesis en animales con neurogénesis incrementada, promueve el regreso del miedo.

A pesar de que nuestro protocolo de IRR fue hecho con precisión, decidimos realizar un experimento para afirmar que nuestros resultados eran dependientes de la menor cantidad de neuronas. Para ello, enriquecimos el ambiente de las ratas utilizando una rueda para correr, túneles y juguetes para roer. Se ha visto que el ejercicio voluntario promueve la neurogénesis, por lo que es una buena opción para elevar los niveles de neuronas nuevas (van Praag *et al.*, 1999). Durante el enriquecimiento las ratas fueron radiadas, las ratas IRR-enriquecidas mostraron niveles de miedo similares al primer experimento, mientras que las controles-enriquecidas no. Por lo que los resultados muestran que es la ablación de la neurogénesis la que promueve el regreso del miedo. Asimismo, observamos una correlación significativa entre el número de neuronas inmaduras y la conducta, lo cual demostró que la ablación de la neurogénesis *después* de la extinción promueve el regreso del miedo.

Estos resultados muestran que la neurogénesis juega un rol importante ante la necesidad de aprender que una situación ha dejado de ser peligrosa. Esta investigación muestra nueva información sobre los mecanismos que subyacen el regreso del miedo y puede tener aplicación psiquiátrica en personas que presenten algún desorden psiquiátrico.

De manera general, todos los mamíferos, se ven en situaciones de peligro. Estas situaciones generan miedo el cual permite desencadenar conductas necesarias para sobrevivir. Por otro lado, las experiencias peligrosas pueden cambiar a seguras y es una adaptación la posibilidad de aprender las reglas nuevas mediante la extinción.

Por todo esto podemos inferir es que es posible que la neurogénesis adulta haya tenido un papel adaptativo importante durante la evolución de los mamíferos. Estudios recientes han observado que las neuronas nuevas pueden desestabilizar sinapsis viejas, y removiendo estas sinapsis es más fácil aprender que la misma situación puede cambiar de peligrosa a segura (Toni *et al.*, 2007; Akers *et al.*, 2014). Nuestros resultados muestran que las neuronas nuevas son necesarias para distinguir entre la memoria peligrosa del condicionamiento y la segura de la extinción. Puesto que sin ellas los animales presentan mayor regreso del miedo.

12. Conclusión

La neurogénesis hipocampal adulta parece jugar un rol importante en el regreso del miedo, modulando los circuitos de miedo. En concreto, hemos mostrado que la neurogénesis es necesaria tras el aprendizaje de extinción para modular el regreso del miedo. Nuestros resultados sugieren que esta modulación se da a través de CA3 y su interacción con otras estructuras como *subículum* que a su vez afecta la actividad de la corteza medial prefrontal. Sin embargo, estos resultados muestran que es necesario investigar más acerca de cómo la neurogénesis modula las memorias de miedo. Un punto importante a investigar, es como el re-arreglo sináptico que producen las nuevas neuronas, afecta la modulación de las memorias de condicionamiento y extinción.

Es importante remarcar que si las nuevas neuronas están involucradas en la modulación del regreso del miedo, como este trabajo sugiere; se podrían utilizar clínicamente para tratar pacientes con enfermedades psiquiátricas que involucren problemas para inhibir el miedo.

13. Referencias

- Agetsuma, M., H. Aizawa, T. Aoki, R. Nakayama, M. Takahoko, M. Goto, T. Sassa, R. Amo, T. Shiraki, K. Kawakami, T. Hosoya, S. Higashijima and H. Okamoto (2010). "The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish." Nat Neurosci **13**(11): 1354-1356.
- Akers, K. G., A. Martinez-Canabal and L. Restivo (2014). "Hippocampal Neurogenesis Regulates Forgetting During Adulthood and Infancy."
- Amaral, D. G. (1993). "Emerging principles of intrinsic hippocampal organization." Curr Opin Neurobiol **3**(2): 225-229.
- Amaral, D. G. (2003). "The amygdala, social behavior, and danger detection." Ann N Y Acad Sci **1000**: 337-347.
- Amaral, D. G. and M. P. Witter (1989). "The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data." Neuroscience **31**(3): 571-591.
- Bendesky, A. and C. I. Bargmann (2011). "Genetic contributions to behavioural diversity at the gene-environment interface." Nat Rev Genet **12**(12): 809-820.
- Besnard, A. and A. Sahay (2016). "Adult Hippocampal Neurogenesis, Fear Generalization, and Stress." Neuropsychopharmacology **41**(1): 24-44.
- Blanchard, D. C. and R. J. Blanchard (1972). "Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions." J Comp Physiol Psychol **81**(2): 281-290.
- Bouton, M. E. (2002). "Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction." Biol Psychiatry **52**(10): 976-986.
- Bouton, M. E. (2004). "Context and behavioral processes in extinction." Learn Mem **11**(5): 485-494.
- Bouton, M. E., R. F. Westbrook, K. A. Corcoran and S. Maren (2006). "Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms." Biol Psychiatry **60**(4): 352-360.

- Brown, J. P., S. Couillard-Despres, C. M. Cooper-Kuhn, J. Winkler, L. Aigner and H. G. Kuhn (2003). "Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis." J Comp Neurol **467**(1): 1-10.
- Burgos-Robles, A., I. Vidal-Gonzalez, E. Santini and G. J. Quirk (2007). "Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex." Neuron **53**(6): 871-880.
- Corcoran, K. A., T. J. Desmond, K. A. Frey and S. Maren (2005). "Hippocampal inactivation disrupts the acquisition and contextual encoding of fear extinction." J Neurosci **25**(39): 8978-8987.
- Corcoran, K. A. and S. Maren (2004). "Factors regulating the effects of hippocampal inactivation on renewal of conditional fear after extinction." Learn Mem **11**(5): 598-603.
- Corcoran, K. A. and G. J. Quirk (2007). "Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears." J Neurosci **27**(4): 840-844.
- Darwin, C. (1872). The expression of the emotions in man and animals. London,, J. Murray.
- Drapeau, E., W. Mayo, C. Aurousseau, M. Le Moal, P. V. Piazza and D. N. Abrous (2003). "Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(24): 14385-14390.
- Fanselow, F. S. (2000). "Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus." Behav Brain Res.
- Fanselow, M. S. (1990). "Factors Governing One-Trial Contextual Conditioning." Animal Learning & Behavior **18**(3): 264-270.
- Feng, R., C. Rampon, Y. P. Tang, D. Shrom, J. Jin, M. Kyin, B. Sopher, M. W. Miller, C. B. Ware, G. M. Martin, S. H. Kim, R. B. Langdon, S. S. Sisodia and J. Z. Tsien (2001). "Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces." Neuron **32**(5): 911-926.

- Goldman, S. A. and F. Nottebohm (1983). "Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(8): 2390-2394.
- Goldstein, M. L. (1965). "Effects of Hippocampal, Amygdala, Hypothalamic and Parietal Lesions on a Classically Conditioned Fear Response." Psychol Rep **16**: 211-219.
- Goutagny, R., M. Loureiro, J. Jackson, J. Chaumont, S. Williams, P. Isope, C. Kelche, J. C. Cassel and L. Lecourtier (2013). "Interactions between the lateral habenula and the hippocampus: implication for spatial memory processes." Neuropsychopharmacology **38**(12): 2418-2426.
- Hikosaka, O. (2010). "The habenula: from stress evasion to value-based decision-making." Nat Rev Neurosci **11**(7): 503-513.
- Hobin, J. A., K. A. Goosens and S. Maren (2003). "Context-dependent neuronal activity in the lateral amygdala represents fear memories after extinction." J Neurosci **23**(23): 8410-8416.
- Hobin, J. A., J. Ji and S. Maren (2006). "Ventral hippocampal muscimol disrupts context-specific fear memory retrieval after extinction in rats." Hippocampus **16**(2): 174-182.
- Ji, J. and S. Maren (2007). "Hippocampal involvement in contextual modulation of fear extinction." Hippocampus **17**(9): 749-758.
- Jimenez, S. A. and S. Maren (2009). "Nuclear disconnection within the amygdala reveals a direct pathway to fear." Learn Mem **16**(12): 766-768.
- Jin, J. and S. Maren (2015). "Fear renewal preferentially activates ventral hippocampal neurons projecting to both amygdala and prefrontal cortex in rats." Sci Rep **5**: 8388.
- Kaplan, M. S. and J. W. Hinds (1977). "Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs." Science **197**(4308): 1092-1094.
- Kempermann, G., H. Song and F. H. Gage (2015). "Neurogenesis in the Adult Hippocampus." Cold Spring Harb Perspect Biol **7**(9): a018812.

- Kim, U. and T. Lee (2012). "Topography of descending projections from anterior insular and medial prefrontal regions to the lateral habenula of the epithalamus in the rat." Eur J Neurosci **35**(8): 1253-1269.
- Kitamura, T., Y. Saitoh, N. Takashima, A. Murayama, Y. Niibori, H. Ageta, M. Sekiguchi, H. Sugiyama and K. Inokuchi (2009). "Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory." Cell **139**(4): 814-827.
- Knapska, E., M. Macias, M. Mikosz, A. Nowak, D. Owczarek, M. Wawrzyniak, M. Pieprzyk, I. A. Cymerman, T. Werka, M. Sheng, S. Maren, J. Jaworski and L. Kaczmarek (2012). "Functional anatomy of neural circuits regulating fear and extinction." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(42): 17093-17098.
- Knapska, E. and S. Maren (2009). "Reciprocal patterns of c-Fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala after extinction and renewal of conditioned fear." Learn Mem **16**(8): 486-493.
- Ko, H. G., D. J. Jang, J. Son, C. Kwak, J. H. Choi, Y. H. Ji, Y. S. Lee, H. Son and B. K. Kaang (2009). "Effect of ablated hippocampal neurogenesis on the formation and extinction of contextual fear memory." Mol Brain **2**: 1.
- LeDoux, J. (2012). "Rethinking the emotional brain." Neuron **73**(4): 653-676.
- LeDoux, J. E. (2000). "Emotion circuits in the brain." Annual Review of Neuroscience **23**: 155-184.
- Leuner, B., S. Mendolia-Loffredo, Y. Kozorovitskiy, D. Samburg, E. Gould and T. J. Shors (2004). "Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory." J Neurosci **24**(34): 7477-7481.
- Likhtik, E., D. Popa, J. Apergis-Schoute, G. A. Fidacaro and D. Pare (2008). "Amygdala intercalated neurons are required for expression of fear extinction." Nature **454**(7204): 642-645.
- Manko, M., R. Geracitano and M. Capogna (2011). "Functional connectivity of the main intercalated nucleus of the mouse amygdala." J Physiol **589**(Pt 8): 1911-1925.

- Maren, S. (1999). "Neurotoxic or Electrolytic Lesions of the Ventral Subiculum Produces Deficits in the Acquisition and Expression of Pavlovian Fear Conditioning in Rats " Behavioral Neuroscience **113**: 283-290.
- Maren, S. (2001). "Neurology of Pavlovian Fear Conditioning."
- Maren, S. (2003a). "The amygdala, synaptic plasticity, and fear memory." Ann N Y Acad Sci **985**: 106-113.
- Maren, S. (2003b). "What the amygdala does and doesn't do in aversive learning." Learn Mem **10**(5): 306-308.
- Maren, S. (2005). "Building and burying fear memories in the brain." Neuroscientist **11**(1): 89-99.
- Maren, S. (2008). "Pavlovian fear conditioning as a behavioral assay for hippocampus and amygdala function: cautions and caveats." Eur J Neurosci **28**(8): 1661-1666.
- Maren, S. (2014). "Fear of the unexpected: hippocampus mediates novelty-induced return of extinguished fear in rats." Neurobiol Learn Mem **108**: 88-95.
- Maren, S. and J. A. Hobin (2007). "Hippocampal regulation of context-dependent neuronal activity in the lateral amygdala." Learn Mem **14**(4): 318-324.
- Maren, S. and W. G. Holt (2000). "The hippocampus and contextual memory retrieval in Pavlovian conditioning." Behav Brain Res.
- Martinez-Canabal, A. (2013). "The dentate gyrus of the hippocampus: roles of transforming growth factor beta1 (TGFβ1) and adult neurogenesis in the expression of spatial memory."
- Matsumoto, M. and O. Hikosaka (2007). "Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons." Nature **447**(7148): 1111-1115.

- Murphy, T. H., P. F. Worley and J. M. Baraban (1991). "L-type voltage-sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes." Neuron **7**(4): 625-635.
- Orsini, C. A. and S. Maren (2012). "Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation." Neurosci Biobehav Rev **36**(7): 1773-1802.
- Pan, Y. W., G. C. Chan, C. T. Kuo, D. R. Storm and Z. Xia (2012). "Inhibition of adult neurogenesis by inducible and targeted deletion of ERK5 mitogen-activated protein kinase specifically in adult neurogenic regions impairs contextual fear extinction and remote fear memory." J Neurosci **32**(19): 6444-6455.
- Pavlov (1927). Conditioned Reflexes. New York, Oxford University Press.
- Phillips, R. G. and J. E. LeDoux (1994). "Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning." Learn Mem **1**(1): 34-44.
- Quirk, G. J. and D. Mueller (2008). "Neural mechanisms of extinction learning and retrieval." Neuropsychopharmacology **33**(1): 56-72.
- Rescorla, R. A. (2004). "Spontaneous recovery." Learn Mem **11**(5): 501-509.
- Rescorla, R. A. and C. D. Heth (1975). "Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus." J Exp Psychol Anim Behav Process **1**(1): 88-96.
- Rola, R., J. Raber, A. Rizk, S. Otsuka, S. R. VandenBerg, D. R. Morhardt and J. R. Fike (2004). "Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice." Exp Neurol **188**(2): 316-330.
- Shors, T. J., D. A. Townsend, M. Zhao, Y. Kozorovitskiy and E. Gould (2002a). "Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning." Hippocampus **12**(5): 578-584.

- Shors, T. J., D. A. Townsend, M. R. Zhao, Y. Kozorovitskiy and E. Gould (2002b). "Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning." Hippocampus **12**(5): 578-584.
- Sierra-Mercado, D., Jr., K. A. Corcoran, K. Lebron-Milad and G. J. Quirk (2006). "Inactivation of the ventromedial prefrontal cortex reduces expression of conditioned fear and impairs subsequent recall of extinction." Eur J Neurosci **24**(6): 1751-1758.
- 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.
- Snyder, J. S., N. S. Hong, R. J. McDonald and J. M. Wojtowicz (2005). "A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory." Neuroscience **130**(4): 843-852.
- Sotres-Bayon, F., D. E. Bush and J. E. LeDoux (2004). "Emotional perseveration: an update on prefrontal-amygdala interactions in fear extinction." Learn Mem **11**(5): 525-535.
- Sotres-Bayon, F., D. E. Bush and J. E. LeDoux (2007). "Acquisition of fear extinction requires activation of NR2B-containing NMDA receptors in the lateral amygdala." Neuropsychopharmacology **32**(9): 1929-1940.
- Sotres-Bayon, F., C. K. Cain and J. E. LeDoux (2006). "Brain mechanisms of fear extinction: historical perspectives on the contribution of prefrontal cortex." Biol Psychiatry **60**(4): 329-336.
- Sotres-Bayon, F., L. Diaz-Mataix, D. E. Bush and J. E. LeDoux (2009). "Dissociable roles for the ventromedial prefrontal cortex and amygdala in fear extinction: NR2B contribution." Cereb Cortex **19**(2): 474-482.
- Sotres-Bayon, F. and G. J. Quirk (2010). "Prefrontal control of fear: more than just extinction." Curr Opin Neurobiol **20**(2): 231-235.
- Sotres-Bayon, F., D. Sierra-Mercado, E. Pardilla-Delgado and G. J. Quirk (2012). "Gating of fear in prelimbic cortex by hippocampal and amygdala inputs." Neuron **76**(4): 804-812.

- Toni, N., E. M. Teng, E. A. Bushong, J. B. Aimone, C. Zhao, A. Consiglio, H. van Praag, M. E. Martone, M. H. Ellisman and F. H. Gage (2007). "Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus." Nat Neurosci **10**(6): 727-734.
- van Praag, H., G. Kempermann and F. H. Gage (1999). "Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus." Nat Neurosci **2**(3): 266-270.
- 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." Learn Mem **13**(6): 728-733.
- Wang, Z., L. Wang, R. Yamamoto, T. Sugai and N. Kato (2013). "Role of the lateral habenula in shaping context-dependent locomotor activity during cognitive tasks." Neuroreport **24**(6): 276-280.
- Winocur, G., J. M. Wojtowicz, M. Sekeres, J. S. Snyder and S. Wang (2006). "Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function." Hippocampus **16**(3): 296-304.
- Wojtowicz, J. M. (2006). "Irradiation as an experimental tool in studies of adult neurogenesis." Hippocampus **16**(3): 261-266.
- Zelikowsky, M., S. Hersman, M. K. Chawla, C. A. Barnes and M. S. Fanselow (2014). "Neuronal ensembles in amygdala, hippocampus, and prefrontal cortex track differential components of contextual fear." J Neurosci **34**(25): 8462-8466.
- Zhang, C. L., Y. Zou, W. He, F. H. Gage and R. M. Evans (2008). "A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour." Nature **451**(7181): 1004-1007.
- Zhang, J., L. Tan, Y. Ren, J. Liang, R. Lin, Q. Feng, J. Zhou, F. Hu, J. Ren, C. Wei, T. Yu, Y. Zhuang, B. Bettler, F. Wang and M. Luo (2016). "Presynaptic Excitation via GABAB Receptors in Habenula Cholinergic Neurons Regulates Fear Memory Expression." Cell **166**(3): 716-728.
- Zhao, C., W. Deng and F. H. Gage (2008). "Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis." Cell **132**(4): 645-660.