



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR-DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS

**LA HABÉNULA LATERAL FACILITA RESPUESTAS DEFENSIVAS
ÚNICAMENTE CUANDO LAS MEMORIAS DE PELIGRO Y SEGURIDAD ESTÁN
EN CONFLICTO**

TESIS

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

PRESENTA:

LEÓN GERÓNIMO PAVEL VELÁZQUEZ HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. FRANCISCO SOTRES BAYÓN - INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTOR

DR. JOSÉ ALONSO FERNÁNDEZ GUAISTI

DRA. ANGÉLICA ZEPEDA RIVERA

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE

INVESTIGACIONES MÉDICAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. MAYO 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos:

Agradezco a la Dra. Leticia Ramírez Lugo por el apoyo técnico brindado durante el desarrollo del trabajo experimental que contiene esta tesis.

Agradezco al Dr. Francisco Sotres por el tiempo y empeño que puso para guiarme y formarme como científico. Su guía fue y será siempre fundamental en mi camino de la investigación.

Asímismo, agradezco a todos mis compañeros de laboratorio por el tiempo que me brindaron para escuchar y discutir conmigo sobre cada tema que en algún momento fue relevante para llevar a cabo el desarrollo de esta tesis.

Agradezco también a mis tutores Dr. Alonso Fernández Guasti y Dra. Angélica Zepeda Rivera, por su tiempo y consejos brindados a lo largo de todo mi entrenamiento.

Agradezco profundamente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por permitirme ser parte de su historia y forjarme ahora como un investigador. En este mismo plano, agradezco al Movimiento de Aspirantes Excluidos de la Educación Superior (MAES), porque a través de la lucha social, creamos una puerta para que todo aquel que busque seguir una formación académica, lo pueda hacer. Ellos me mostraron el camino.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante toda mi formación durante el doctorado a través de la beca 658352.

Contenido

Abreviaturas	7
Definición de variables operacionales	8
Resumen	10
Abstract	11
Introducción	12
El miedo como vehículo de supervivencia.....	12
Condicionamiento al peligro: Aprendiendo a temer.....	13
¿Huir o congelarse? Una conducta para la supervivencia.....	16
Extinción del miedo: Aprendiendo a no temer.....	18
La habénula lateral codifica estímulos aversivos y de recompensa.....	22
Planteamiento del problema	24
Hipótesis	25
Objetivos	25
Objetivo general.....	25
Objetivos particulares.....	26

Variables	26
Variables independientes.....	26
Variables dependientes.....	26
Material y métodos	27
Animales.....	27
Cirugía.....	27
Conducta.....	28
Condicionamiento y extinción.....	29
Inhibición latente.....	30
Evitación mediada por la plataforma (EMP).....	30
Prueba de campo abierto.....	31
Prueba de palanqueo.....	31
Microinyección.....	31
Histología.....	32
Recolección de datos y análisis.....	33
Resultados	34
La inactivación de la HbL no afecta la formación de una memoria ni la respuesta defensiva	34
La inactivación de la HbL no afecta la memoria de peligro ni la formación o evocación de la memoria de extinción.....	34
La inactivación de la HbL perjudica la facilitación de respuestas defensivas después de un entrenamiento de extinción.....	35
El efecto de la inactivación de la HbL durante la prueba es dependiente de la memoria de extinción y no es atribuible a una afección locomotora u otras conductas emocionales motivadas.....	39
La inactivación de la HbL perjudica las respuestas defensivas durante la recuperación de la memoria de inhibición latente.....	41
La inactivación de la HbL facilita la búsqueda de recompensa en lugar de	

promover conductas defensivas.....	47
Discusión.....	48
La HbL promueve estrategias defensivas únicamente durante la competencia de memorias de peligro/seguridad.....	50
La Hbl promueve respuestas defensivas durante una prueba de elección guiada por un conflicto.....	53
La HbL como un nodo integrador de información aversiva y apetitiva.....	54
Conclusión.....	55
Apéndice.....	57
Inmunohistoquímica.....	57
Referencias.....	59

Abreviaturas

Am	Amígdala
AmC	Amígdala central
CMPF	Corteza prefrontal
Cond	Condicionamiento
DA	Dopamina
EMP	Evitación mediada por la plataforma
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
Ext	Extinción
HbL	Habénula lateral
HbM	Habénula medial
IL	Corteza infralímbica
Inf	Infusión
IV	Intervalo Variable
M&B	Muscimol y baclofen
NMDA	N-metil de aspartato
PFA	Paraformaldehído
PL	Corteza prelímbica
SAL	Salina
SGPA	Sustancia gris periacueductal
Sup palanqueo	Supresión de palanqueo
ATV	Área tegmental ventral

Definición de variables operacionales

- **Ansiedad:** Respuesta defensiva que no necesita de un entrenamiento previo para facilitar una respuesta defensiva ante un estímulo específico o un contexto nuevo. La forma en cómo se evaluó fue a través de la cuantificación de cruces por el centro de un campo abierto.
- **Condicionamiento al peligro:** Asociación entre un estímulo neutro (tono) y uno significativo (descarga eléctrica) que a través de la presentación continua del estímulo neutro, seguido del estímulo significativo, facilitan la generación de una respuesta defensiva inmediata. La forma en cómo se evaluó fue a través de la cuantificación de la ausencia total de movimiento excepto por la frecuencia respiratoria, la supresión de palanqueo y la evitación de la descarga eléctrica a través de subirse a una plataforma.
- **Congelamiento:** Definido como la ausencia total de movimiento excepto por la frecuencia respiratoria. Herramienta utilizada para evaluar la respuesta defensiva de la rata durante un estímulo aversivo
- **Entrenamiento de extinción:** Se define como el proceso de aprendizaje por el cual el sujeto deja de generar una respuesta defensiva ante un estímulo (por ejemplo, un tono) que previamente fue asociado a un estímulo aversivo (por ejemplo, una descarga eléctrica), adquiriendo así una memoria de seguridad. Se lleva a cabo mediante la presentación del estímulo neutro (tono) pero sin la presentación del estímulo significativo (descarga eléctrica). La forma en cómo se evaluó fue a través de la desaparición de la respuesta de congelamiento y la supresión de palanqueo.
- **Evitación activa mediada por la plataforma:** Respuesta defensiva en la cual el sujeto decide moverse hacia un lugar seguro (plataforma) y quedarse ahí en tanto existe una señal de peligro. La forma en cómo se

evaluó fue a través de cuantificar el tiempo que el animal pasaba sobre la plataforma durante la presentación del tono.

- **Inhibición latente:** Proceso mediante el cual el sujeto adquiere una memoria de seguridad a través de la presentación de tonos sin descarga eléctrica, volviendo a este un estímulo familiar seguro. La forma en cómo se evaluó fue a través de la cuantificación de la respuesta de congelación y supresión de palanqueo durante el condicionamiento al peligro el cual se llevó a cabo al día siguiente de la inhibición latente.
- **Memoria de peligro:** Es la evocación de la memoria adquirida a través del condicionamiento al peligro, generando así respuestas defensivas. La forma en cómo se evaluó fue a través de la cuantificación del congelamiento, supresión de palanqueo y respuesta de evitación activa durante la presentación del tono (estímulo de peligro), después de que el sujeto fue condicionado.
- **Memoria de seguridad:** Es la evocación de la memoria adquirida a través del entrenamiento de extinción o inhibición latente. La evocación de esta memoria disminuye las respuestas defensivas. La forma en cómo se evaluó fue a través de la cuantificación del congelamiento y supresión de palanqueo después de haber recibido el entrenamiento de extinción o de inhibición latente.
- **Respuestas defensivas:** Se define como una respuesta fisiológica de adaptación ante una situación de peligro, produciendo cambios que preparan al cuerpo para generar una respuesta conductual (congelamiento, evitación, detener la búsqueda de alimento, etc.) que facilite la supervivencia.

Resumen

La supervivencia depende de la capacidad de reaccionar de forma adaptativa o de llevar a cabo acciones basadas en experiencias aversivas previas. Aunque la actividad de la habénula lateral (HbL) ha sido ampliamente relacionada con la regulación de las respuestas motivadas por la aversión, no es claro bajo qué condiciones esta estructura cerebral es necesaria para regular las respuestas defensivas ante una amenaza. Para abordar esta cuestión, combinamos herramientas farmacológicas con tareas conductuales que implican eventos aversivos y apetitivos, y evaluamos las respuestas defensivas en ratas. Descubrimos que la inactivación farmacológica de la HbL no afecta al aprendizaje ni la memoria del condicionamiento de peligro (miedo) ni de la extinción (seguridad), y tampoco las conductas de ansiedad o de búsqueda de recompensas. Sorprendentemente, descubrimos que la inactivación de la HbL abolía las respuestas defensivas reactivas (congelamiento provocado por el tono) sólo cuando la memoria de peligro (condicionamiento) y de seguridad (extinción e inhibición latente) competían durante la recuperación de memorias. De forma consistente, encontramos que la inactivación de la HbL perjudicó las respuestas defensivas activas (evitación mediada por la plataforma), sesgando así el comportamiento de elección (entre evitar una amenaza o acercarse a la comida) hacia respuestas de búsqueda de una recompensa. En conjunto, nuestros hallazgos sugieren que la actividad de la HbL interviene en las respuestas defensivas sólo cuando son guiadas por recuerdos de peligro y seguridad que compiten entre sí, revelando así una participación de la HbL en el conflicto emocional dependiente de la experiencia.

Abstract

Survival depends on the ability to adaptively react or execute actions based on previous aversive salient experiences. Although lateral habenula (LHb) activity has been broadly implicated in the regulation of aversively motivated responses, it is not clear under which conditions this brain structure is necessary to regulate defensive responses to a threat. To address this issue, we combined pharmacological inactivations with behavioral tasks that involve aversive and appetitive events and evaluated defensive responses in rats. We found that LHb pharmacological inactivation did not affect cued threat conditioning (fear) and extinction (safety) learning and memory, anxiety-like or reward-seeking behaviors. Surprisingly, we found that LHb inactivation abolished reactive defensive responses (tone-elicited freezing) only when threat (conditioning) and safety memories (extinction and latent inhibition) compete during retrieval. Consistently, we found that LHb inactivation impaired active defensive responses (platform-mediated avoidance), thereby biasing choice behavior (between avoiding a threat or approaching food) towards reward-seeking responses. Together, our findings suggest that LHb activity mediates defensive responses only when guided by competing threat and safety memories, consequently revealing a previously uncharacterized role for LHb in experience-dependent emotional conflict.

Introducción

El miedo como vehículo de sobrevivencia

En la isla de Borneo, un mono narigudo, se encuentra reposando en un árbol, sin embargo, el calor de la isla le ha provocado sed, así que decide bajar del árbol en el que se encontraba para dirigirse a beber agua del río Pawan. Él sabe que al hacerlo corre el riesgo de que uno de sus principales depredadores, el cocodrilo, pueda atacarlo. Sin embargo, la sed es tanta que el mono se decide a bajar y acercarse al agua con mucha precaución, pero ha escuchado un ruido que le hace sentir una amenaza y quedarse inmóvil y, en una fracción de segundo, ha corrido alejándose del río. Esa respuesta defensiva probablemente le salvó la vida al mono.

La respuesta defensiva ante un peligro, se ha definido como una respuesta fisiológica defensiva y de adaptación ante una situación de peligro (Bendesky and Bargmann, 2011; Darwin, 2013), produce ciertos cambios en el cuerpo como aceleración de la frecuencia cardiaca y respiratoria, dilatación de la pupila, mayor flujo sanguíneo a los músculos, etc. que lo preparan para generar una respuesta conductual que facilite la supervivencia (Price et al., 2013; Cascardi et al., 2015; Rodriguez-Romaguera et al., 2020; Constantinou et al., 2021). Este tipo de respuestas defensivas son tan relevantes para los organismos vivos que todos las presentan (aunque el proceso activador depende del organismo). La relación presa-depredador es un ejemplo de cómo el miedo ante un peligro facilita una respuesta defensiva ante un depredador. Se sabe que la presencia de objetos que guardan una similitud con la de un depredador, generan una respuesta defensiva automática (Amaral, 2003). Así entonces, ésta es una respuesta evolutiva, dado que cada organismo a través de generaciones va adaptando dichas respuestas. Por ejemplo, es probable que nuestro mono narigudo no hubiese generado una respuesta defensiva ante la presencia de algo parecido a un gorrión, porque sus ancestros aprendieron que esta especie no ponía en peligro su existencia, sin embargo, al encontrar características parecidas a las de un cocodrilo, le hizo saber que era muy probable que uno de sus principales depredadores lo estuviera

acechando. Así, la pregunta sugerida es ¿de qué manera se aprende a tener miedo ante estímulos peligrosos?

Condicionamiento al peligro: Aprendiendo a temer

El miedo innato es una respuesta evolutiva ante una amenaza en la que de forma “irracional” tememos a algo y por la cual se genera una respuesta defensiva. Los roedores, por ejemplo, tienen miedo a los espacios abiertos, a áreas iluminadas, etc. Los humanos, por otro lado, tenemos miedo a las alturas, a la oscuridad, etc. Sin embargo, también aprendemos a tener miedo con base en experiencias; más allá, aprendemos a generar asociaciones entre un estímulo neutro y uno significativo (LeDoux, 2000; Cardinal et al., 2002) que a su vez, facilitan generar una respuesta inmediata. A esta asociación entre estímulos se le conoce como *condicionamiento clásico*. La forma de estudiar respuestas defensivas dentro del laboratorio es a través del *condicionamiento al peligro*. Éste ocurre cuando un estímulo neutro, se asocia con una consecuencia aversiva. Por ejemplo, una rata al escuchar un tono, no genera algún tipo de respuesta defensiva, sino hasta que esta recibe una ligera descarga eléctrica seguida del tono; la ocurrencia de este fenómeno por varias ocasiones hace que la rata aprenda que el tono es el predictor de algo aversivo y por tanto, desarrollará una respuesta defensiva al escucharlo. En este fenómeno el tono es conocido como estímulo condicionado (EC) y la descarga eléctrica como estímulo incondicionado (EI).

En las neurociencias, así como en la psicología experimental, es precisamente el fenómeno del condicionamiento el ha permitido el estudio de las señales cerebrales que desarrollan una conducta defensiva. La primera forma en cómo se abordó este fenómeno fue a través de extirpaciones de zonas específicas del cerebro. Pavlov, a finales del siglo XIX identificó en su experimento más famoso que los perros asociaban el sonido de una campana con la entrega de un alimento y como consecuencia, los animales al escucharla comenzaban a salivar, pero el experimento fue más allá: después de identificar este fenómeno, se preguntó qué ocurriría si el condicionamiento fuera hacia algo aversivo; así

entonces, presentaba una elipse (EC) seguido de una descarga eléctrica (EI). Los animales generaron la asociación y desarrollaron un miedo por la figura. Luego fue igualando los ejes de la elipse de forma que la elipse cada vez era más parecida a un círculo. En un momento determinado los perros, incapaces de discriminar entre el círculo y la elipse, entraban en una especie de neurosis experimental, como la llamó Pavlov, caracterizada por una ansiedad (miedo) en los animales. Más tarde, descubrió que la extirpación de la corteza prefrontal hacía que esta conducta aversiva, desapareciera. Esto dio pie a las lobotomías por las cuales Egas Moniz recibió el premio nobel en 1949.

Más adelante, los investigadores intentaron ser más puntuales sobre las áreas cerebrales que investigaban, así entonces comenzaron a hacer lesiones en distintas estructuras. Una de las que adquirió mayor interés, fue la amígdala cerebral (Am). Al lesionarla identificaron que el sujeto no era capaz de generar la asociación para el condicionamiento, es decir, que por más que presentaran el tono seguido de la descarga eléctrica, la rata no generaba respuestas defensivas ante el tono (Maren et al., 1996; Maren, 1999; Blair et al., 2005). Luego se preguntaron si la Am era necesaria para generar este aprendizaje o también lo era para recordar la asociación una vez que ésta se había aprendido. Para ello, lesionaron la estructura después de que el animal había adquirido el condicionamiento. Los animales no lograban recordar que el tono precedía la descarga. Así entonces, concluyeron que la Am era necesaria para generar un condicionamiento y también para recordar la asociación (Maren et al., 1996; Maren, 1999). Resultados similares se han descrito al realizar protocolos conductuales iguales, pero sustituyendo la lesión por inactivaciones farmacológicas temporales (Muller et al. 1997; Helmstetter and Bellgowan 1994; Blair et al. 2005). La ventaja de la técnica de inactivación es que se evita lesionar fibras de paso (como ocurre con las lesiones electrolíticas), es decir, neuronas que se encuentran en otra región del cerebro y que están proyectando hacia otra región (distinta al área de estudio) pero que las fibras atraviesan justo por el área de interés. Es decir, al hacer una lesión electrolítica, se corre el riesgo de que el

posible efecto a evaluar no sea por la lesión del área de estudio (la Am en este caso) sino por la interrupción de la comunicación entre dos estructuras, dada por dichas fibras de paso. Otra ventaja de la técnica es que uno puede evaluar a un mismo sujeto en dos momentos distintos de la tarea. Por ejemplo, en el experimento de lesión en la Am descrito anteriormente, podría inactivarse la estructura durante la asociación y al día siguiente (ya con la estructura activa), probar si el sujeto recuerda o no el significado del tono. Así, inactivando la Am, identificaron que esta es necesaria para generar un aprendizaje asociativo (tono+descarga eléctrica) así como para evocar dicho aprendizaje (Muller et al., 1997; Sierra-Mercado et al., 2011).

Bajo la misma técnica de inactivación, se han explorado un sinfín de estructuras cerebrales para probar su participación en las respuestas defensivas de condicionamiento al peligro. Por ejemplo, se ha descrito que la inactivación farmacológica de la corteza preímbica (PL) (un área de la corteza medial prefrontal (CMPF)), impide que los animales evoquen la memoria de peligro creada el día anterior. Lo mismo se ha descrito al inactivar el hipocampo ventral (Sierra-Mercado et al., 2011). Sin embargo, la participación del hipocampo dorsal ha tenido mayor relevancia en la señalización de pistas contextuales, como textura, olor, color, forma, etc. que con condicionamiento a un sonido, como un tono (Anagnostaras et al., 2001).

Los estudios en los que se ha investigado de manera aislada la participación de las estructuras en la generación de una respuesta defensiva, dieron pie al análisis de la conexión entre dichas estructuras. Así, se ha descrito que la Am envía proyecciones a PL, generando la activación de neuronas excitatorias (glutamatérgicas). Estas mismas neuronas acumulaban información de otras estructuras para procesarla en conjunto y enviar el resultado del proceso de vuelta a la Am y ésta a su vez, enviar el mensaje de qué respuesta defensiva facilitar: huir o congelarse (Sotres-Bayon and Quirk, 2010). Estos experimentos

han planteado las bases para comprender de qué forma el cerebro facilita una respuesta defensiva ante una amenaza.

¿Huir o congelarse? Una conducta para la sobrevivencia.

La manera en cómo el sujeto afronta una amenaza (huir o congelarse) depende de las regiones del cerebro que se activen, así como el tipo de neuronas activadas. En una situación de amenaza, la primera respuesta de sobrevivencia es intentar huir. La primera estructura encargada de codificar la situación de riesgo es la Am (Ledoux et al., 1986; Lázaro-Muñoz et al., 2010), ésta envía la información a la PL para la evaluación de la amenaza. Por otro lado, se sabe que la corteza infralímbica (IL), área limítrofe de la PL, es una región necesaria para generar una respuesta de evitación, si esta región es inhibida farmacológicamente o lesionada, los animales dejan de huir ante la amenaza (Quirk et al., 2000; Chang and Maren, 2010). Además, se sabe que una lesión en la región central de la Am (AmC), facilita la respuesta de evitación, contrario a lo que ocurre con la IL, así entonces, se sabe que la IL se activa para enviar proyecciones inhibitorias hacia la AmC y así facilitar la respuesta de evitación (Moscarello and LeDoux, 2013). Otra estructura involucrada en la respuesta de evitación es el estriado ventral. La dopamina (DA), neurotransmisor relacionado con la búsqueda de recompensa, el aprendizaje y la locomoción, es necesaria para activar neuronas específicas dentro de la Am y el estriado ventral, si los receptores a este neurotransmisor son inhibido en el estriado, los animales no son capaces de huir del peligro (Darvas et al., 2011).

Por otro lado, si el intento de huida no es exitoso, el sujeto reestructura la respuesta defensiva y es entonces que adquiere una respuesta de congelamiento. Esta respuesta defensiva es evolutiva. Se piensa que la intención de adquirir esta conducta es para pasar desapercibido ante aquello que representa la amenaza (Blanchard and Blanchard, 1971). Algunas estructuras que participan en la respuesta de evitación, también lo hacen en la respuesta de congelamiento. Dado que, la Am es la primera estructura que recibe la alerta de peligro, no es de

sorprender que tenga una participación relevante en ambos tipos de respuesta defensiva. Se sabe que ésta se activa, envía información a la PL, ésta hace una evaluación con base en esta información y la de otras estructuras; si la evaluación es generar una respuesta de congelamiento, entonces envía dicho mensaje a la Am, ésta se activa, envía proyecciones para activar a la sustancia gris periacueductual (SGPA) y esta envía la señal para que el animal se congele. Si esta comunicación se afecta, entonces el sujeto deja de generar la respuesta de congelamiento (LeDoux et al., 1988). La mayoría de los paradigmas conductuales utilizados para evaluar la respuesta de evitación, son las llamadas *shuttle box*; éstas son cajas divididas en dos compartimentos exactamente iguales. El piso está hecho de rejillas de acero para permitir la conducción de corriente eléctrica y así generar una ligera descarga en las patas de los animales. Dicha descarga esta señalizada por una pista, como un tono, así el animal sabe que al escuchar el tono, debe cambiar de compartimento, de lo contrario, recibirá la descarga. A este cambio de compartimento es al cual se le ha definido como respuesta de evitación. Sin embargo, este paradigma tiene una peculiaridad: los animales nunca tienen un lugar seguro donde sepan que jamás recibirán la descarga, por tanto, un porcentaje de ellos adquieren una respuesta de congelamiento, lo cual impide comprender de forma clara el fenómeno de evitación. Para resolver el problema, Bravo-Rivera et al., (2014), idearon un paradigma al cual llamaron evitación mediada por la plataforma (EMP), el cual el piso era una rejilla de acero para permitir la conducción de una descarga eléctrica. Este paradigma tenía dos zonas; la zona de amenaza, en la cual los animales se debían mantener para presionar una palanca y recibir comida agradable, y la zona de seguridad, en la cual había una plataforma en la que ellos se podían mantener para evitar una descarga eléctrica. La descarga eléctrica estaba señalizada por un tono, así los animales al escucharlo, sabían que debían dejar de palanquear y moverse a la plataforma para evitar la descarga. A través de la combinación de inactivaciones farmacológicas con este paradigma, reveló que la PL, el estriado, y la Am, son necesarios para promover una respuesta de evitación.

Aún cuando los mecanismos cerebrales para generar una respuesta de huida o congelamiento son similares, existen ciertas diferencias que resultan elementales para adquirir una conducta que dé mayor probabilidad de sobrevivencia. Sin embargo, la sobrevivencia también depende de generar actualizaciones sobre una memoria de peligro. Es decir, identificar y recordar una pista que nos hace saber que hay una amenaza latente, es importante para adquirir las respuestas antes mencionadas. Sin embargo, aprender que esta pista en algún momento deja de ser peligrosa, también resulta importante para dicha sobrevivencia.

Extinción del miedo: Aprendiendo a no temer.

Imaginemos que uno siempre mantiene la memoria de peligro con respecto a una pista, y que dicha memoria es imposible de actualizar. Si esto ocurriera, nuestro mono narigudo, de sólo ver el agua, escuchar sonidos relacionados con ella, etc. generaría la misma respuesta defensiva de huida o congelamiento, aún cuando el cocodrilo no estuviera cerca, intentando acecharlo. La consecuencia de este persistente e inactualizable miedo sería, probablemente, que el mono no moriría devorado por el cocodrilo, sino de sed.

La extinción, es una herramienta de sobrevivencia tan importante como la misma respuesta defensiva ante el peligro. Es importante mencionar que este fenómeno de extinción es el proceso de un nuevo aprendizaje, independiente de la memoria del peligro (Santini et al., 2004; Herry et al., 2006). Es decir, la adquisición de memoria de extinción no borra ni elimina a la memoria de peligro (Quirk, 2002a). La forma de estudiar la memoria de extinción dentro de un laboratorio es a través del condicionamiento clásico. Es decir, una vez que el sujeto aprende la asociación en la que el tono predice la descarga eléctrica y que ésta puede ser evaluada conductualmente, entonces se comienza con el entrenamiento de extinción el cual consiste en presentar únicamente el estímulo condicionado (tono). De esta forma, el sujeto, al escuchar el tono desarrollará la

misma respuesta defensiva, sin embargo, la presentación continua del tono sin la descarga eléctrica, desarrollará este nuevo aprendizaje de extinción.

El fenómeno de extinción se comenzó a estudiar casi a la par en el que se comenzó el de condicionamiento. Pavlov identificó que aquellos animales a los que previamente había condicionado (sonido de campana + comida) dejaban de salivar después de que en varias ocasiones, escuchaban la campana pero no se les entregaba la comida (Pavlov, 2010). Desde entonces, este fenómeno ha sido replicado incontables ocasiones en los laboratorios en los que se estudia el aprendizaje por medio de asociación (Berman and Dudai, 2001; Milad and Quirk, 2012; VanElzakker et al., 2014).

Uno de los primeros acercamientos para comprender qué ocurría durante la extinción y si ésta era una nueva memoria o sólo estaba inhibiendo a otra, fue a través de un modelo de evitación. En éste, la descarga eléctrica (EI) estaba señalizada por luz (EC). Para evitar la descarga eléctrica, el sujeto debía brincar hacia un poste. A los sujetos experimentales se les administraba un inhibidor de la síntesis de proteínas necesarias para el aprendizaje, de forma subcutánea. Con esto, identificaron que la administración impedía que los animales aprendieran la extinción y sugirieron que ésta era la formación de una nueva memoria (Flood et al., 1977). Por otro lado, se ha descrito también que al administrar un antagonista noradrenérgico de forma sistémica, se reduce la expresión de un miedo asociativo, por ejemplo, tono (EC) + descarga eléctrica (EI) (Rodríguez-Romaguera et al., 2009).

De los primeros pasos para abordar la participación del cerebro en el proceso de extinción, fue la administración de vasopresina (un tipo de hormona) de manera intra-cerebrovascular durante la tarea de evitación previamente descrita. Con este experimento, observaron que después de varios días en los que se presentaba sólo el EC, las ratas seguían teniendo una respuesta de evitación (Koob et al., 1986). Más adelante comenzaron a hacer lesiones en zonas

específicas del cerebro. Encontraron que, al lesionar la corteza visual en ratas, éstas podían adquirir la memoria de peligro (flashes de luz (EC) + descarga eléctrica (EI)), sin embargo, tenían un retardo para extinguir la respuesta defensiva cuando el EC no era reforzado por el EI. Esto comparado con animales que no habían sido lesionados (LeDoux et al., 1989). Más adelante se preguntaron si, dado que la Am era necesaria para la formación de una memoria de peligro, también lo sería para la de extinción. Así, comenzaron a explorar, administrando antagonistas de N-metil de aspartato (NMDA), un importante receptor involucrado en el aprendizaje, en sujetos que previamente habían adquirido una memoria de peligro. Los resultados fueron que los animales que habían recibido el antagonista, no podían formar una memoria de extinción lo cual provocaba que los animales no dejaran de generar respuestas defensivas (Falls et al., 1992; Sotres-Bayon et al., 2007). Más adelante se identificó que el receptor NR2B, dentro de la amígdala lateral, era el encargado de la formación de la memoria de extinción (Sotres-Bayon et al., 2009). Dado que la Am tiene proyecciones bidireccionales con la PL y que esta forma parte de la corteza medial prefrontal (CMPF) y que, además, su comunicación con la Am es esencial para la expresión de la memoria de peligro (Sotres-Bayon et al., 2004, 2006, 2012; Pendyam et al., 2013), no era difícil suponer que el siguiente paso en la exploración del aprendizaje de extinción del peligro fuera precisamente realizar manipulaciones sobre esta área. Haciendo lesiones en esta región, identificaron que los animales podían generar una memoria de peligro, pero no una memoria de extinción (Morgan et al., 1993), y que particularmente la PL era necesaria para la consolidación de la memoria de extinción, ya que si esta se inhibía inmediatamente después del entrenamiento de extinción, los animales al día siguiente generaban el mismo nivel de respuestas defensivas que aquellos animales que no habían recibido el entrenamiento de extinción (Sotres-Bayon et al., 2009). En esta misma línea, por medio de inactivaciones farmacológicas, se probó que al inhibir el hipocampo ventral, se desinhibían las interneuronas (neuronas inhibitorias) de la PL, facilitando así un aumento en las respuestas condicionadas dadas a través de un estímulo peligroso (Sotres-Bayon et al., 2012). Estos resultados demostraron que el aumento de la

actividad en neuronas excitatorias de la PL, es necesario para la evocación de una memoria de peligro y que su inhibición o lesión podría facilitar una memoria de extinción.

Dado que la CMPF está conformada por la PL y IL, era necesario dilucidar si ambas regiones corticales pudieran tener una participación diferencial en la formación y evocación de la memoria de extinción. Para ello, se realizaron inactivaciones farmacológicas durante la adquisición de la memoria de extinción. Con ello identificaron que la PL no era necesaria para la formación ni evocación de la memoria de extinción. Sin embargo, al inactivar la IL vieron que había un retardo en la disminución del congelamiento durante la adquisición de la memoria. Además, el resultado más sobresaliente fue que 24 hrs. después de la adquisición, los animales al escuchar el tono, volvían a generar una respuesta defensiva como si nunca hubieran pasado por el entrenamiento de extinción. La conclusión de esta investigación fue que la IL es necesaria para la formación de una memoria de extinción (Sierra-Mercado et al., 2011).

Además de probar que la IL es necesaria para la formación de una memoria de extinción, también se ha probado que la actividad de esta es suficiente. Para saberlo, probaron estimulando eléctricamente y de forma pareada con la presentación del EC y sin la presentación del EI. El resultado fue que los animales que recibían la estimulación eléctrica en la IL pareada sólo con el tono, tenían una disminución acelerada de la respuesta defensiva, no así los animales que no recibían la estimulación o que ésta se presentaba desfasada con el tono (Milad and Quirk, 2002). Así se definió que la IL es suficiente y necesaria para la formación de una memoria de extinción.

Más adelante, se analizó qué tipo de neuronas eran las responsables de la IL para facilitar la memoria de extinción. Por medio de la técnica de optogenética, una novedosa técnica que por medio de herramientas moleculares y ópticas, se puede manipular de manera específica un tipo neuronal, activándolas o

inhibiéndolas, para identificar su participación durante un evento, realizaron la activación de neuronas glutamatérgicas de la IL durante la formación de la memoria de extinción e identificaron que, al hacerlo, se aceleraba el proceso de extinción y que el efecto facilitaba la formación de la memoria, ya que al probar 24 hrs. después, ya sin estimulación, los animales no desarrollaban una respuesta defensiva. Por otro lado, si estas neuronas eran silenciadas, los animales no podían generar la memoria de extinción, ya que al probarlas 24 hrs. después, los animales tenían altos niveles de congelamiento. Si la activación se realizaba al día siguiente de que los animales habían adquirido la memoria de extinción, el efecto era similar en ambos casos (Do-Monte et al., 2015).

La habénula lateral codifica estímulos aversivos y de recompensa

La habénula es una estructura epitalámica que está presente en todos los organismos vertebrados (Concha and Wilson, 2001) y, aunque recientemente se han descrito múltiples subnúcleos, ésta se divide principalmente en dos: la parte medial y lateral. El área medial ha sido más relacionada con las adicciones nicotínicas (Fowler et al., 2011; Frahm et al., 2011), mientras que la lateral está involucrada en respuestas defensivas (Stamatakis and Stuber, 2012; Amo et al., 2014; Martínez-Canabal et al., 2019; Trusel et al., 2019; Stephenson-Jones et al., 2020). En 2007, Matsumoto y Hikosaka, en un experimento en monos, identificaron que las neuronas de la HbL generaban un aumento en la amplitud (activación) de su disparo cuando estos recibían un estímulo aversivo. De forma interesante identificaron que estas mismas neuronas se inhibían al recibir una recompensa. Más adelante, en 2009 observaron que estas neuronas respondían al aprendizaje por condicionamiento, es decir que sólo con el hecho de presentarles una imagen que había sido asociada previamente al estímulo (aversivo o gratificante), dichas neuronas se activaban (Matsumoto and Hikosaka, 2009). Esta investigación reveló que la HbL tenía una participación en la codificación de estímulos opuestos y sugería que podría regular conductas relacionadas a ellos. Además, se ha estudiado la relación de esta estructura con la respuesta de evitación; así, en el paradigma de *shuttle box* descrito anteriormente,

han identificado que la HbL se activa al recibir la descarga eléctrica y al escuchar la señal que indica la presencia de la descarga. Además identificaron que la inhibición de receptores glutamatérgicos, provoca la desaparición de la respuesta de evitación (Trusel et al., 2019). En esta misma línea, identificaron que la activación por medio de optogenética de la HbL, facilita la respuesta de evitación, cambiando de compartimentos con mayor velocidad que los animales control (Stamatakis and Stuber, 2012), mientras que la lesión lo impide (Thornton and Bradbury, 1989). En el mismo sentido, en un estudio de evitación innata (exposición al olor de un depredador), identificaron que dicha aproximación activaba la HbL. Sin embargo, al lesionarla, los animales exploraban y se aproximaban al estímulo, perdiendo la respuesta de evitación. Por otro lado, también se ha reportado que lesiones electrolíticas facilitan la respuesta de evitación (Wilson et al., 1972; Song et al., 2017). Así mismo, algunos otros estudios arrojan resultados en los que no encuentran diferencias (Vale-Martínez et al., 1997). El conjunto de estos experimentos no son concluyentes acerca de la participación de la HbL en la respuesta de evitación.

Si bien, la mayoría de la investigación sobre la participación de la HbL en respuestas conductuales ha sido inclinada hacia los estímulos aversivos, recientemente se ha descrito que ésta también es capaz de regular respuestas relacionadas con la recompensa a través de la inhibición de la actividad (Hong and Hikosaka, 2008; Matsumoto and Hikosaka, 2009; Stamatakis et al., 2013). Por ejemplo, se ha descrito que la inhibición de la HbL a través del hipotálamo lateral, genera una respuesta de preferencia de lugar, mientras que la activación, genera la conducta opuesta (Stamatakis et al., 2016). Así, se ha descrito que la HbL podría ser una estructura clave para regular respuestas de aproximación y alejamiento ante estímulos aversivos y de recompensa. En este mismo sentido, se ha descrito que la HbL es una estructura que permite evaluar y generar una conducta de elección. En 2014, (Stopper and Floresco, 2014) identificaron que al inactivar farmacológicamente la HbL en ratas, estas perdían el sesgo de ir en búsqueda de la recompensa más grande, mostrando así una indiferencia. En otros

estudios han identificado la inactivación de la estructura impide que el sujeto elija la opción correcta para obtener una recompensa (Baker and Mizumori, 2017; Mathis et al., 2017).

Así, dado que la HbL está implicada no sólo en respuestas aversivas y de recompensa, sino también en la selección de una acción; es probable que esta estructura esté involucrada en la regulación de conductas relacionadas con respuestas de evitación ante una amenaza o de aproximación hacia un estímulo seguro; de la misma forma podría estar regulando conductas en las que se desafía a un individuo a seleccionar una acción entre estímulos opuestos (amenaza vs seguridad/recompensa) y así generar una respuesta conductual adaptativa.

Planteamiento del problema

Una respuesta conductual defensiva ante un estímulo que plantea una amenaza, es fundamental para la sobrevivencia de un ser vivo; sin embargo, en ocasiones dicho estímulo deja de representar una amenaza. Aprender que el estímulo ha dejado de ser peligroso para así dejar de generar respuestas defensivas, también resulta trascendente para sobrevivir. Gracias al estudio del fenómeno conductual de condicionamiento y la extinción, en conjunto con distintas técnicas de lesión, inactivación, activación y registro de actividad cerebral, se ha logrado comprender cuáles son las principales regiones que subyacen para la formación y mantenimiento de una memoria de peligro así como una memoria de extinción. Se sabe que el fenómeno de extinción es un nuevo mecanismo de aprendizaje y memoria, es decir que es una memoria que se construye de forma paralela a la memoria de peligro y como tal, no la elimina. A pesar del esfuerzo para comprender este fenómeno de memorias paralelas, se desconoce de qué manera el cerebro facilita una memoria de peligro o una memoria de extinción, cuando ambas subyacen, generando así la respuesta más apropiada para sobrevivir.

La habénula lateral (HbL) es una estructura epitalámica, su actividad ha sido relacionada con la entrega y aprendizaje de estímulos negativos (por ejemplo, la entrega de una descarga eléctrica o la ausencia de una recompensa esperada). Por otro lado, también se ha demostrado que señala estímulos positivos (por ejemplo, la entrega de una recompensa o la omisión de un estímulo aversivo esperado). En estudios recientes se ha descrito que al inactivarla, se genera un sesgo en la conducta de elección.

Aunque la HbL es capaz de facilitar respuestas guiadas con base en experiencias previas de estímulos negativos o positivos, poco se ha explorado sobre su participación en la regulación de respuestas defensivas durante la adquisición o evocación de una memoria de peligro o extinción; más allá, se desconoce si, dadas sus cualidades en la evaluación de estímulos negativos y positivos, esta estructura podría regular conductas defensivas durante el aprendizaje, la memoria, o bien, durante la competencia de memorias que compiten por el control de la conducta.

Hipótesis

Dado que se ha descrito una relación entre el incremento de actividad de la HbL y respuestas conductuales aversivas, al inactivar farmacológicamente (muscimol y baclofen) dicha estructura durante la evocación de una memoria de peligro, habrá una disminución en las respuestas defensivas, comparado con el grupo control al cual únicamente se le administrará el vehículo (solución salina).

Objetivos

Objetivo general.

- Identificar si la HbL es necesaria para facilitar respuestas defensivas asociadas a la formación o evocación de una memoria de peligro.

Objetivos particulares.

- Estandarización de tareas conductuales basadas en condicionamiento clásico y operacional para la evaluación de respuestas defensivas.
- Identificar si la HbL es necesaria para la formación de una memoria de peligro.
- Identificar si la HbL es necesaria para la evocación de una memoria de peligro.
- Identificar si la HbL es necesaria para la formación de una memoria de seguridad dada por el entrenamiento de extinción.
- Identificar si la HbL es necesaria para la evocación de una memoria de seguridad.
- Identificar si la HbL es necesaria para promover una respuesta defensiva durante la competencia de memorias (peligro vs. seguridad).
- Identificar si la actividad de la HbL facilita respuestas defensivas impidiendo el promover la búsqueda de una recompensa.

Variables

Variables independientes.

- Entrenamiento de condicionamiento al peligro
- Entrenamiento de evitación mediada por la plataforma
- Entrenamiento de inhibición latente
- Entrenamiento de extinción
- Entrenamiento de palanqueo
- Microinyección de fármacos inhibitorios (grupo experimental) o vehículo (grupo control).

Variables dependientes.

- Respuestas defensivas durante la administración de los fármacos inhibitorios.
- Respuestas de aproximación y búsqueda de alimento durante la administración de los fármacos inhibitorios.

Material y métodos

Animales

Se utilizaron 144 ratas macho Wistar, proporcionadas por el bioterio del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los animales pesaban entre 260 y 280 gr. con una edad aproximada de 75 días postnatales al momento de la entrega. Todos los animales fueron colocados de forma individual en cajas de acrílico (46 cm x 25 cm x 20 cm), dentro de un cuarto con luz controlada en un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 horas, así como temperatura y humedad (22 ± 2 °C). El acceso a comida (BioInvert) y agua fue de libre acceso, siempre que el protocolo experimental no indicara lo contrario. Durante la restricción de comida, los animales recibieron 12 gr. de alimento por día para facilitar que los animales presionaran una palanca para recibir alimento agradable (Bioserv, Flemington, NJ) durante las pruebas conductuales. Los animales fueron manipulados al menos siete días previos a las inactivaciones farmacológicas. Todos los experimentos conductuales se llevaron a cabo en el ciclo de luz (entre 7:00 y 19: hrs).

Cirugía

Para la implantación de cánulas, cada rata fue anestesiada por medio de isoflurano (gas inhalante) dentro de una caja sellada para evitar la volatilidad del gas. En el estereotáxico quirúrgico (David Kopf modelo 900) fue adaptada una boquilla para mantener a los animales anestesiados por medio del gas durante toda la cirugía. Así mismo, todo el tiempo de cirugía, los animales permanecieron sobre un colchón térmico para mantener su temperatura estable. Una vez que los animales estaban completamente anestesiados, se colocaron sobre el estereotáxico para fijar su cráneo y realizar la implantación de cánulas bilaterales (A-M Systems) de calibre 23, dirigidas hacia la HbL por medio de coordenadas (-3.6 mm, AP, ± 0.8 mm, -4.2 mm DV respecto a bregma). Dichas cánulas fueron ancladas por dos tornillos colocados, cada uno, en la parte anterior y posterior del cráneo; además se fijaron con acrílico dental. Las cánulas se fijaron 0.8 mm por arriba de la estructura blanco. Al término de la cirugía se colocó un obturador en

cada cánula para evitar la obstrucción o suciedad de las mismas. Los animales recibieron comida y agua *ad libitum* siete días posteriores a la cirugía para permitir su completa recuperación previa al inicio de los experimentos.

Conducta

Los animales fueron entrenados a palanquear dentro de una caja operante (53.3 cm x 34.9 cm x 1.3 cm) (Coulbourn Instruments, Allentown, PA) a cambio de recibir comida apetitiva (*pellets* de sacarina) (Dustless Precision Pellets®, 45 mg, Rodent Purifield Diet, BioServ). El piso de las cajas consta de 18 barras metálicas conectadas a un panel para regular la entrega de las descargas eléctricas. Debajo de este piso se encuentra un piso receptor hecho de acrílico liso que tiene como función la recepción de las heces y orina de los animales, evitando que estos tengan contacto con las mismas. En la pared frontal de la caja está situada una palanca en el extremo izquierdo, en la parte central se encuentra el plato receptor de alimento. En la parte de arriba de este mismo panel se encuentra una bocina por la cual se emite el tono. En la pared opuesta se encuentra una tira de led que ilumina la caja con luz blanca. Esta caja se encuentra aislada por medio de otra caja (Med Associates, Burlington, Vermont, VT) que evita que los animales sean distraídos por sonidos externos. Para este entrenamiento, los animales fueron pesados previamente para obtener el peso inicial y con base en este, obtener el peso blanco (el peso aproximado al que los animales debían llegar para iniciar con el entrenamiento de palanqueo). El peso blanco se calculó con base en el peso inicial, restando el 15 % de este para llevar a los animales al 85% de su peso inicial. Para alcanzarlo, los animales recibieron 12 gr de comida por día. Una vez que el peso blanco fue alcanzado, los animales recibieron entre 15 y 18 gr por día de alimento para mantenerlos en el peso blanco. Los animales fueron pesados y monitoreados diariamente para evitar cualquier riesgo de salud. Durante todos los experimentos, los animales tuvieron acceso al agua sin restricciones. Una vez que los animales alcanzaron el peso blanco (entre 5 y 6 días) se dio inicio al entrenamiento de palanqueo. Treinta minutos previos al primer día de entrenamiento, los animales recibieron diez pellets dentro de su caja-hogar para

familiarizarlos con el alimento nuevo y evitar una respuesta de neofobia. Las sesiones de entrenamiento tuvieron una duración de treinta minutos, excepto la primera en la que su duración fue de 35 minutos. El objetivo fue que los animales palanquearan al menos 12 veces por minuto en un programa de refuerzo de intervalo variable (IV) (IV-60 para paradigma de condicionamiento clásico (Sierra-Mercado et al., 2011) e IV-30 para el paradigma de evitación (Bravo-Rivera et al., 2014). Todos los entrenamientos tuvieron una duración de seis días para el paradigma de condicionamiento clásico y cinco días para el paradigma de evitación.

Condicionamiento y extinción

El condicionamiento al tono (peligro) se llevó a cabo en el día 1 del experimento, dentro de las mismas cajas operantes en las que previamente se les entrenó de forma individual a las ratas a palanquear para obtener alimento. Este condicionamiento consistió en presentar cinco tonos seguidos, cada uno, de una descarga eléctrica con la finalidad de que cada rata asociara el tono con un evento de amenaza. Los animales fueron colocados cinco minutos previos a que se presentara el primer tono, la finalidad fue que la asociación de amenaza fuera con el tono y no con el contexto. En el día 2 del experimento, después del condicionamiento, se llevó a cabo el entrenamiento de extinción. Éste consistió en presentar 15 tonos sin descarga eléctrica. Como en el día 1, los animales fueron colocados cinco minutos previos a la presentación del primer tono con la finalidad de identificar si los animales habían adquirido la respuesta defensiva al tono y no al contexto. Para éste, se colocó a cada rata dentro de las cajas cinco minutos previos al primer tono para identificar si los animales tenían alguna respuesta defensiva al contexto. En el día 3, durante la prueba, se colocó a cada rata dentro de las cajas cinco minutos previos al primer tono para identificar respuestas conductuales al contexto. Se presentaron dos tonos para medir la competencia de memorias. Las características de los tonos: 30 s, 4 kHz, 75 dB. Las características de las descargas eléctricas: 0.5 s, 0.6 mA. Los intervalos de presentación entre tonos (ITI) tuvieron un promedio variable de 2 minutos.

Inhibición latente

Para este experimento, los animales fueron entrenados previamente a palanquear. En el día 1 del experimento se colocaron dentro de las cajas operantes por cinco minutos previos al primer tono, luego se presentaron 15 tonos sin descarga eléctrica con la finalidad de que los animales asociaran el tono como un estímulo seguro. En el día 2, los animales se colocaron cinco minutos previos al primer tono, posteriormente se presentaron cinco tonos seguidos de una descarga eléctrica para que los animales asociaran el tono con un evento peligroso. En el día 3, durante la prueba, se colocó a cada rata dentro de las cajas cinco minutos previos al primer tono para identificar respuestas conductuales al contexto. Se presentaron dos tonos para medir la competencia de memorias. Las características de los tonos: 30 s, 4 kHz, 75 dB. Las características de las descargas eléctricas: 0.5 s, 0.6 mA. Los ITI tuvieron un promedio variable de 2 minutos.

Evitación mediada por la plataforma (EMP)

El experimento se llevó a cabo en las mismas cajas operantes (Coulbourn Instruments, Allentown, PA) descritas anteriormente en las que se les entrenó de forma individual a cada rata a presionar la palanca. Las cajas operantes fueron aisladas por medio de otra caja (Med Associates, Burlington, Vermont, VT) que a su vez, se encontraban dentro de una habitación conductual aislada. Durante diez días, cada rata recibió 9 tonos (30 s, 4 kHz, 75 dB) seguidos, cada uno, de una descarga eléctrica (2 s, 0.4 mA) para condicionarlas. A diferencia de los experimentos anteriores de condicionamiento, la descarga fue más larga para hacer que las ratas se movieran hacia la plataforma y de menor intensidad para evitar un condicionamiento tan alto que evitara que los animales pudieran moverse hacia la plataforma. Una plataforma de forma cuadrada de plexiglás color gris (14x14 cm) fue sujeta en la esquina contraria de la palanca para que los animales al subirse en ella pudieran evitar la descarga eléctrica. Durante todo el entrenamiento y prueba, la palanca estuvo disponible para la obtención de pellets para motivar a los animales a dejar la plataforma entre la presentación de los

tonos, facilitando la evaluación de la respuesta de evitación. En el día 11, cada rata recibió dos tonos para probar la recuperación de la memoria.

Prueba de campo abierto

En un espacio abierto (90 x 90 cm) delimitado por muros negros, se colocó de forma individual a cada rata por diez minutos, permitiéndoles explorar toda la superficie. Durante la prueba se evaluó la distancia recorrida para verificar si los animales desempeñaban alguna alteración en la locomoción. Adicionalmente, se contabilizó el número de veces que los animales cruzaron por el centro de la superficie (30 x 30 cm) para evaluar ansiedad en los animales.

Prueba de palanqueo

Las ratas fueron entrenadas de forma individual a palanquear por seis días para obtener pellets como recompensa en un programa de IV-60. El día de prueba, se contabilizó el número de palanqueos que los animales realizaron en un periodo de cinco minutos para evaluar la conducta de búsqueda de recompensa. Las ratas utilizadas en este experimento fueron las mismas que se utilizaron en el experimento de inactivación previa al condicionamiento.

Microinyección

Para inactivar de forma temporal la HbL, se utilizaron fármacos agonistas a GABA-A (Muscimol) y a GABA-B (Baclofen) (M&B; Sigma-Aldrich). El coctel se preparó el mismo día de la infusión utilizando como vehículo solución salina fisiológica filtrada (SAL). La infusión de M&B (50 ng de cada fármaco/0.2 µl por lado) o SAL se llevó a cabo a una velocidad de 0.2 µl en 45 sec. a través de las cánulas implantadas, para llegar a la zona blanco de la HbL. Las cánulas fueron conectadas a través de un tubo de polietileno a jeringas de 10 µl (Hamilton). El émbolo de las jeringas fueron controlados a través de una bomba de microinyección (KD Scientific). Los inyectores se quedaron un minuto extra después de la inyección para permitir la difusión de la fármaco. El protocolo de microinyección así como la utilización de los fármacos fueron elegidos con base en un estudio previo de evaluación de la

inactivación de la HbL en una tarea conductual (Stopper and Floresco, 2014).

Histología

Al finalizar los experimentos conductuales, las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (150 mg/kg, i.p.). Una vez que los animales dejaron de tener reflejos sensoriales, los animales fueron colocados en posición decúbito supino para realizar una disección en la parte media del tórax, dividirlo en dos y exponer el corazón para insertar en él una aguja en el ventrículo izquierdo. A través de la aguja comenzó el flujo de SAL regulado a través de una bomba de perfusión (Masterflex L/S, 772400-00, 100 rpm). Inmediatamente después, se cortó el la aurícula derecha para permitir el flujo sanguíneo. Se infundió 200 ml de SAL por cada rata. Una vez que se detuvo el flujo de SAL, se extrajo el cerebro y se mantuvo almacenado por dos días en paraformaldehído (4 % Sigma) para fijar el tejido. Al término de este tiempo, la solución fue cambiada por sacarosa (30% Sigma) y se mantuvieron ahí por cinco días para crioproteger el tejido. Posteriormente los cerebros fueron cortados en un plano coronal en rebanadas de 45 µm utilizando un criostato (Leica, CM1520) y teñidos con violeta de cresilo para la identificación de cuerpos del Nissl. Luego de esto, las rebanadas fueron examinadas bajo un microscopio de campo de luz (Nikon, H550S) para verificar la punta de los inyectores (Figura 1). Únicamente los inyectores de las ratas que cayeron dentro de la HbL fueron incluidas en el análisis estadístico; excepto en un experimento en el que también se incluyó como un grupo aparte a los animales cuyo inyector quedó fuera de la HbL.

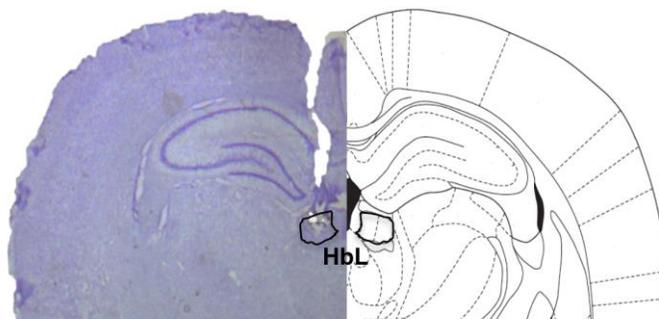


Figura 1.- Corte coronal del cerebro de una rata con la colocación de la cánula localizada en la habénula lateral. Izquierda, fotomicrografía representativa de un corte coronal teñido con Nissl (45 μ m) de un cerebro de rata con la colocación de la cánula localizada en la habénula lateral (HbL). Derecha, sección coronal del atlas del cerebro de una rata (-3,6 mm respecto al bregma; adaptado de Paxinos y Watson (1998) que ilustra la localización y los límites de la HbL.

Recolección de datos y análisis

El análisis conductual se realizó de manera automática por medio de un software (ANY-maze; Stoelting Co., IL, USA). Toda la conducta fue video-grabada por medio de cámaras (Logitech) posicionadas dentro de la caja que permitieron visualizar todo el campo de las pruebas conductuales. El análisis conductual para evaluar respuestas defensivas fueron: **1)** congelamiento; definido como la ausencia de movimiento excepto el respiratorio. Se cuantificó el congelamiento durante el tono y durante los primeros cinco minutos previos a la presentación del primer tono. Esta conducta fue expresada en porcentaje. **2)** supresión de palanqueo; definido como la cuantificación en el número de palanqueos durante el tono (30 sec), comparado con el número de veces que palanquearon 30 segundos previos al tono. La representación gráfica fue calculada por medio de la siguiente formula $(\text{pretono} - \text{tono}) / (\text{pretono} + \text{tono})$; así el valor de cero representó no supresión de palanqueo (una baja respuesta defensiva) mientras que el valor de +1 representó una total supresión de palanqueo (alta respuesta defensiva). **3)** Evitación; definido como el tiempo que cada rata pasaba sobre la plataforma durante y previo al tono. Adicionalmente, para analizar el aprendizaje de evitación durante el entrenamiento, se cuantificó el porcentaje de ratas que efectivamente evitaron la descarga eléctrica dada en los últimos dos segundos de tono.

La programación de las descargas eléctricas, la presentación del tono y la entrega de comida por activación de la palanca, se controlaron a través del software GraphicState4TM. Y un controlador *Habitest Coulborn SELF-POWERED LINC H02-01-220*. La generación de la descarga eléctrica fue a través del *Precision animal shocker* de *Coulborn instruments*. El análisis estadístico se realizó por medio del software (*STATISTICA; StatSoft, Tulsa, OK*) utilizando una

prueba *t de Student* no pareada de dos colas, ANOVA de una vía, ANOVA de dos vías seguida por una prueba posthoc Fisher, según el requerimiento del análisis y Prism (Graphpad, La Jolla, CA) para la elaboración de gráficas.

Resultados

La inactivación de la HbL no afecta la formación de una memoria ni la respuesta de defensiva.

Para evaluar si la participación de la HbL era necesaria para generar una respuesta defensiva o la formación de la misma, realizamos la microinyección para inactivar farmacológicamente la HbL previo al condicionamiento realizado en el día 1. (Figura 2A). Encontramos que la inactivación de la HbL no impide que las ratas generen una respuesta defensiva. Así mismo, en los primeros tonos del día 2, demostraron que recordaban el condicionamiento aprendido en el día 1; esto a través de respuestas defensivas similares al grupo control (Figura 2B) (día 1, congelamiento: $F_{(1,10)} = 0.71$, $p = 0.41$; supresión de palanqueo: SAL: $t_{(10)} = -0.25$, $p = 0.80$). (día 2, congelamiento $t_{(10)} = 0.03$, $p = 0.96$; supresión de palanqueo: $t_{(10)} = 0.26$, $p = 0.79$). De igual forma, la inactivación de la HbL previa al condicionamiento no afecta la adquisición de la memoria de seguridad al día siguiente del condicionamiento o la memoria de esta dos días después, como se indica por similares respuestas defensivas entre grupos en el entrenamiento de extinción (día 2, congelamiento: $F_{(6,60)} = 0.61$, $p = 0.71$; supresión de palanqueo: $F_{(6,60)} = 0.52$, $p = 0.78$) y en la evocación de la prueba de memoria. (día 3, congelamiento: $t_{(10)} = -0.22$, $p = 0.82$; supresión de palanqueo: $t_{(10)} = 1.12$, $p = 0.28$). Estos hallazgos sugieren que la HbL no es necesaria para generar una respuesta defensiva ni para la formación de una memoria de peligro.

La inactivación de la HbL no afecta la memoria de peligro ni la formación o evocación de la memoria de extinción.

El siguiente paso fue investigar si la HbL era necesaria para evocar una memoria de peligro. Al mismo tiempo probamos si la estructura era necesaria para la formación de una memoria de seguridad. Para probarlo, realizamos el

condicionamiento en el día 1; en el día 2, realizamos la inactivación farmacológica de la HbL al inicio del experimento, previo al entrenamiento de extinción. Un día después, en el día 3, probamos la memoria emocional del tono (Figura 3A). Encontramos que la inactivación de la HbL no impide que las ratas puedan evocar la memoria de peligro adquirida durante el día 1 y tampoco impide la adquisición de la memoria de seguridad (Figura 3B), esto demostrado por respuestas defensivas similares entre grupo M&B y SAL (día 2, congelamiento: $t_{(18)} = -0.35$, $p = 0.72$; supresión de palanqueo: $t_{(18)} = -0.02$, $p = 0.97$) así como durante todo el entrenamiento de extinción (día 2, congelamiento: $F_{(6,108)} = 0.92$, $p = 0.47$; supresión de palanqueo: $F_{(6,108)} = 1.90$, $p = 0.08$), respectivamente. De la misma forma, en el día 3, durante la prueba de memoria, ambos grupos mostraron niveles similares de conducta defensiva (día 3, congelamiento: $t_{(18)} = 0.31$, $p = 0.75$; supresión de palanqueo: $t_{(18)} = 0.18$, $p = 0.85$). Estos resultados son coincidentes con lo que anteriormente se ha reportado (Song et al., 2017). Estos resultados demuestran que la HbL no es necesaria para la evocación de una memoria de peligro, ni para la formación o evocación de una memoria de seguridad.

La inactivación de la HbL perjudica la facilitación de respuestas defensivas después de un entrenamiento de extinción.

Una vez que identificamos que la HbL no era necesaria para la formación ni evocación de la memoria de peligro y seguridad, evaluamos si era necesaria durante la prueba de memoria (día 3), evaluando la respuesta conductual entre la memoria de peligro y la memoria de extinción. Para eso, realizamos el condicionamiento en el día 1. En el día 2, realizamos el entrenamiento de extinción. En el día 3, inactivamos farmacológicamente la HbL, previo a la presentación del primer tono (Figura 4A). Sorprendentemente encontramos que las ratas con la inactivación de la HbL abolieron las respuestas defensivas, presentando niveles similares a los de pre-condicionamiento, a diferencia del grupo control (día 3, congelamiento: SAL: 35.59%; M&B: 8.39%; $t_{(14)} = -3.06$, $p = 0.008$; supresión de palanqueo: SAL: 0.41; M&B: -0.04; $t_{(14)} = -3.22$, $p = 0.006$).

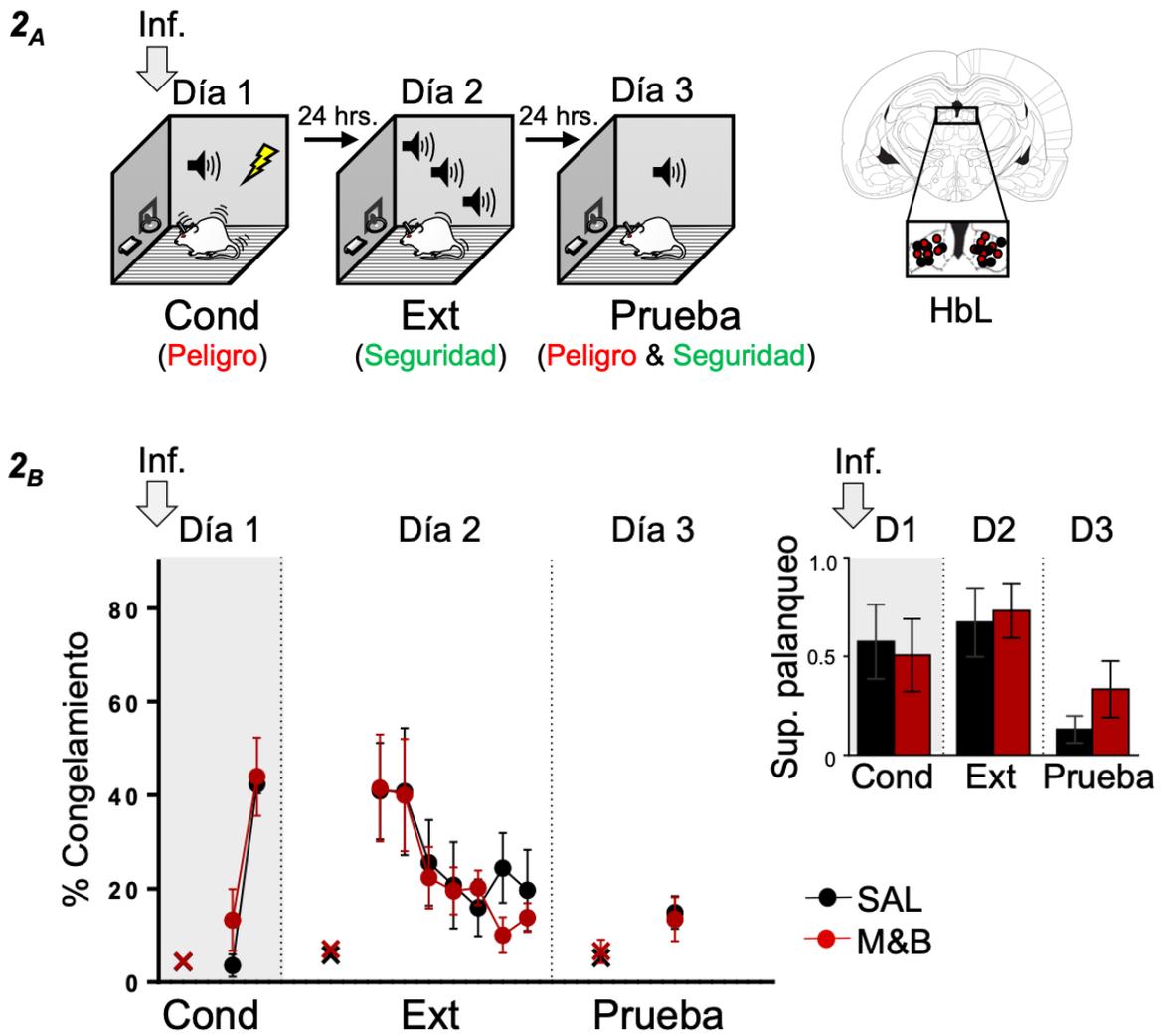


Figura 2.- La inactivación de HbL antes del entrenamiento de peligro no afecta su aprendizaje. 2_A, Izquierda, Representación esquemática del entrenamiento de las ratas. Las ratas fueron infundidas con solución salina (SAL) o muscimol y baclofen (M&B) en la HbL (flecha gris) antes de ser entrenadas para asociar un tono con la descarga eléctrica (día 1; Cond, condicionamiento). Este entrenamiento representa el aprendizaje del peligro (rojo). Un día después, las ratas fueron entrenadas para asociar el mismo tono con la ausencia de la descarga (día 2; Ext, extinción), lo que representa un aprendizaje de seguridad (verde). Por último, al día siguiente, se presentaron a las ratas sólo tonos (día 3, Prueba), lo que implica la competencia de recuperación de memorias de amenaza (rojo) y seguridad (verde) coexistentes para regular las respuestas defensivas. A la derecha, dibujo coronal del atlas cerebral de la rata que muestra la colocación de las puntas de los inyectores en la HbL. 2_B, La inactivación de la HbL antes del condicionamiento de la amenaza (día 1; flecha gris y área sombreada en el gráfico), no afectó al aprendizaje de la amenaza (día 1) ni la formación de su

memoria (día 2), como se indica por niveles similares de congelamiento provocado por el tono y la relación de supresión de palanqueo (recuadro: condicionamiento (último bloque de ensayos de dos tonos), extinción (primer bloque de ensayos de dos tonos) y prueba) entre los grupos (SAL, $n = 5$; M&B, $n = 7$). Los datos se muestran como \pm SEM en bloques de dos tonos. HbL, habénula lateral. Inf, infusión. Sup palanqueo, supresión de palanqueo; x, niveles de congelamiento de la línea base (antes del tono).

Para descartar que este efecto fuera por la inactivación de una estructura circundante, y basado en análisis previos publicados (Stopper and Floresco, 2014), añadimos un tercer grupo formado por aquellas ratas que por error de canulación, fueron inactivadas en una zona inespecífica fuera de la HbL (grupo M&B-fuera) y comparamos los tres grupos (Figura 4B; día 3, congelamiento: SAL: 35.59%, M&B-fuera: 37.64%, M&B: 8.39%; $F_{(2,21)} = 3.54$, $p = 0.04$; post hoc: SAL y M&B: $p = 0.04$, M&B-fuera y M&B: $p = 0.02$, y SAL y M&B-fuera: $p = 0.87$; supresión de palanqueo: SAL: 0.41, M&B-fuera: 0.39, M&B: -0.04; $F_{(2,21)} = 5.28$, $p = 0.01$; post hoc: SAL y M&B: $p = 0.01$, M&B-fuera y M&B: $p = 0.01$, y SAL y M&B-fuera: $p = 0.94$). Este análisis demostró que el efecto en la abolición de respuestas defensivas es específico de la HbL y no de áreas circundantes. Una interpretación que se podría generar a partir de estos resultados es que la inactivación de la HbL impide la evocación de la memoria de seguridad. Sin embargo, esta explicación queda descartada dado que en el experimento de inactivación en el día 2 (ver primer bloque de tonos en el día 2 en Figura 3B), la inactivación de la HbL no impidió que las ratas evocaran la memoria de peligro creada por el condicionamiento en el día 1. Así, identificamos que la actividad de la HbL no es necesaria para la formación o evocación de una memoria de peligro o seguridad, sin embargo sí lo es para mediar respuestas defensivas cuando la memoria de peligro y seguridad compiten por el control de la respuesta conductual.

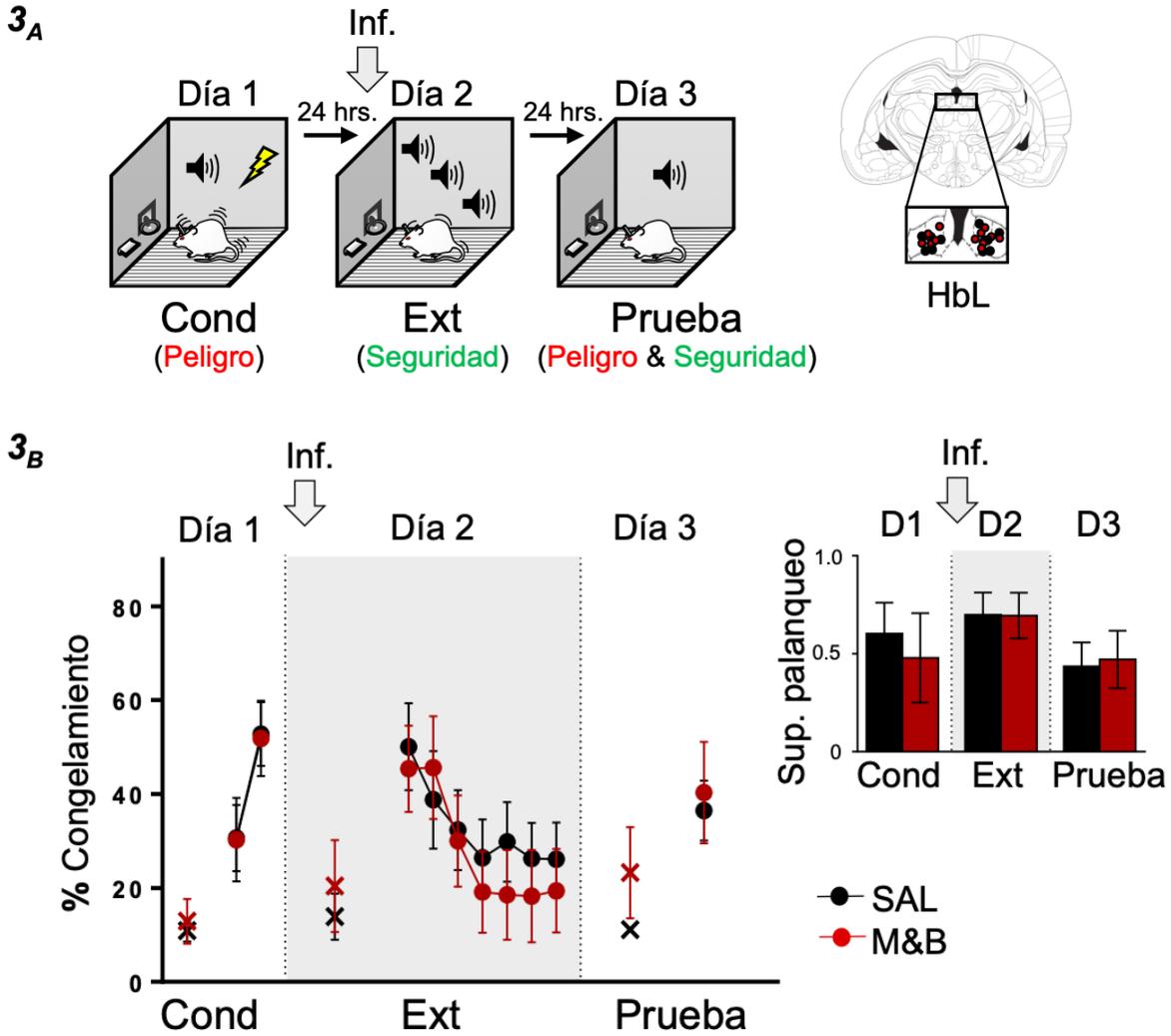


Figura 3.- La inactivación de la HbL antes del entrenamiento de extinción no afecta su aprendizaje ni memoria. 3_A, Izquierda, Representación esquemática del entrenamiento de las ratas. Las ratas fueron entrenadas para asociar un tono con la descarga eléctrica (día 1; Cond, condicionamiento). Este entrenamiento representa el aprendizaje del peligro (rojo). Un día después, las ratas fueron entrenadas para asociar el mismo tono con la ausencia de la descarga. En este día las ratas fueron infundidas con solución salina (SAL) o muscimol y baclofen (M&B) en la HbL (flecha gris) (día 2; Ext, extinción), lo que representa un aprendizaje de seguridad (verde). Por último, al día siguiente, se presentaron a las ratas sólo tonos (día 3, Prueba), lo que implica la competencia de recuperación de memorias de peligro (rojo) y seguridad (verde) coexistentes para regular las respuestas defensivas. A la derecha, dibujo coronal del atlas cerebral de la rata que muestra la colocación de las puntas de los inyectores en la HbL. **3_B**, La infusión de M&B en la HbL antes del entrenamiento de extinción (día 2; flecha gris y área sombreada en gráfica), no afectó, la expresión de la memoria de peligro

(primeros tonos en el día 2), ni el aprendizaje de seguridad (día 2 completo) o a la formación de su memoria (día 3), como se indica por niveles similares de porcentaje de congelamiento y la relación de supresión de palanqueo (recuadro: condicionamiento (último bloque de ensayos de dos tonos), extinción (primer bloque de ensayos de dos tonos) y prueba) entre los grupos (SAL, $n = 11$; M&B, $n = 9$). Los datos se muestran como \pm SEM en bloques de dos tonos. HbL, habénula lateral. Inf, infusión. Sup. palanqueo, supresión de palanqueo. x, niveles de congelamiento de la línea base (antes del tono).

El efecto de la inactivación de la HbL durante la prueba es dependiente de la memoria de extinción y no es atribuible a una afección locomotora u otras conductas emocionales motivadas.

Para evaluar si el impedimento en respuestas defensivas dado por la inactivación de la HbL, durante la prueba, es dependiente de la memoria de extinción, realizamos el condicionamiento en el día 1. En el día 2, colocamos a las ratas dentro de las cajas operantes durante el mismo tiempo de duración del entrenamiento de extinción, pero sin la presentación de los tonos ni las descargas eléctricas (No-Ext). En el día 3, inactivamos farmacológicamente la HbL, previo a la presentación del primer tono (Figura 5A). Encontramos que la inactivación de la HbL en ratas que no recibieron entrenamiento de extinción, presentaron las mismas respuestas defensivas que el grupo control durante la prueba de memorias (Figura 5B) (día 3, congelamiento: $t_{(12)} = -0.76$, $p = 0.45$; supresión de palanqueo: $t_{(12)} = -1.51$, $p = 0.15$). Este resultado es consistente con nuestra interpretación de que el efecto de la inactivación durante la prueba no es porque ésta impida la expresión de respuestas defensivas o la memoria de peligro dada en el día 1, durante el condicionamiento, y que el efecto es dependiente de la memoria de seguridad.

Luego, en un grupo diferente de animales, probamos si la inactivación de la HbL podría estar afectando la motricidad de las ratas o bien, alguna conducta emocional motivada, y que esto pudiera explicar los resultados en la inactivación durante la prueba de memoria (Figura 4). Para esto, inactivamos la HbL en una prueba de campo abierto y una prueba de conducta motivada por apetito para

evaluar la locomoción, efectos relacionados con la ansiedad y búsqueda de recompensa, respectivamente.

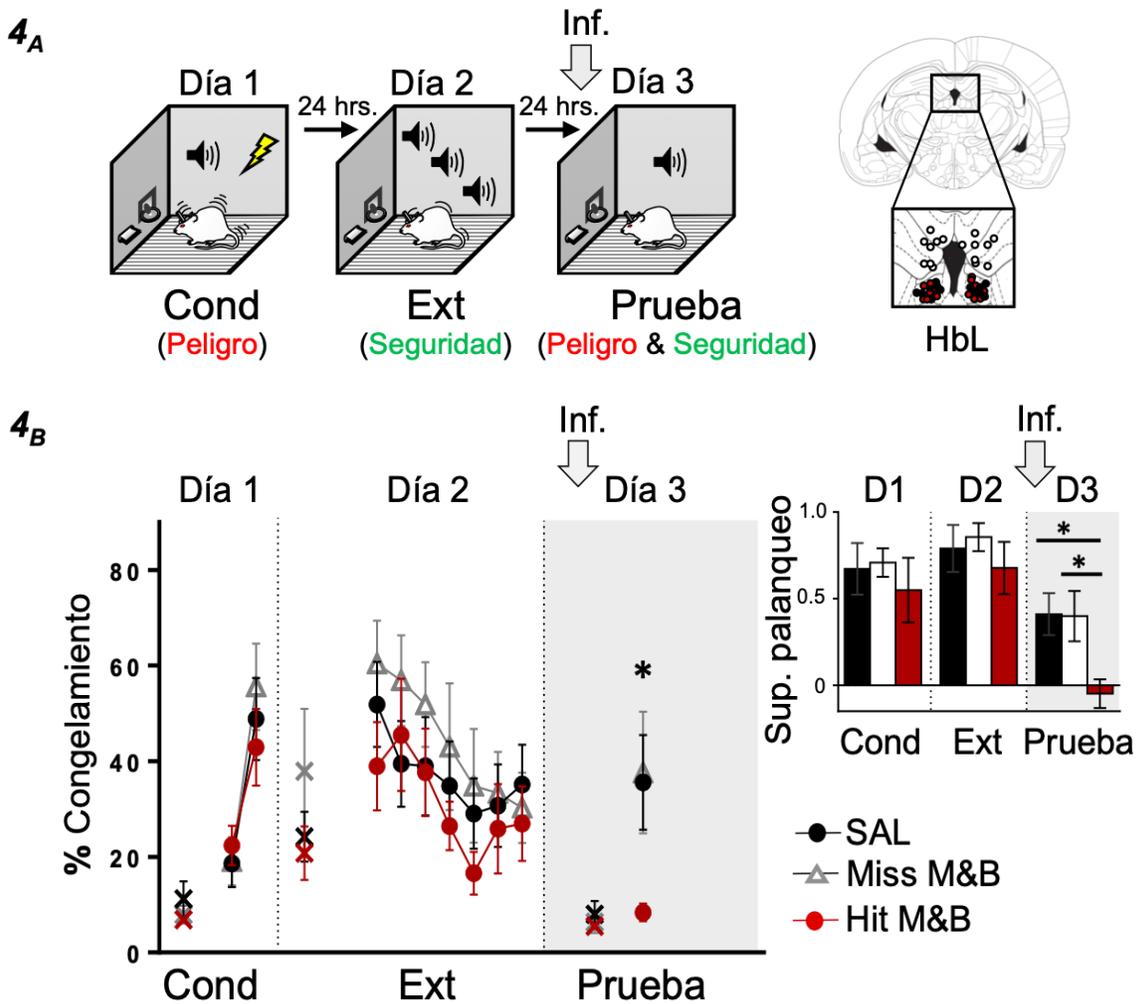


Figura 4.- La inactivación de HbL antes de la prueba de memorias, después de la extinción, suprime las respuestas defensivas. 4_A, Izquierda, Representación esquemática del entrenamiento de las ratas. Las ratas fueron entrenadas para asociar tonos con la descarga eléctrica (día 1; Cond, condicionamiento), lo que representa un aprendizaje de amenaza (rojo). Un día después, las ratas fueron entrenadas para asociar el mismo tono con la ausencia de la descarga eléctrica (día 2; Ext, extinción), lo que representa un aprendizaje de seguridad (verde). Finalmente, al día siguiente, se infundió a las ratas solución salina (SAL) o muscimol y baclofen (M&B) en la HbL (flecha gris) antes de presentarles sólo tonos (día 3, Prueba), lo que implica la competencia de recuperación de memorias de amenaza (rojo) y seguridad (verde) coexistentes

para controlar las respuestas defensivas. Derecha, dibujo coronal del atlas del cerebro de la rata que muestran la colocación de las puntas de los inyectores en la HbL. **4B**, La inactivación de la HbL antes de la prueba de recuperación (día 3), después de la extinción (flecha gris y área sombreada en el gráfico), disminuyó las respuestas defensivas, como indican los niveles más bajos de porcentaje de congelamiento provocada por el tono y la relación de supresión de palanqueo (recuadro: condicionamiento (último bloque de ensayos de dos tonos), extinción (primer bloque de ensayos de dos tonos) y prueba) en el grupo experimental en comparación con los grupos de control (SAL, n = 7; Miss M&B, n = 8; Hit M&B n = 9). Los datos se muestran como \pm SEM en bloques de dos ensayos. HbL, habénula lateral. Inf, infusión. Sup. palanqueo, supresión de palanqueo; x, niveles de congelamiento de línea base (pretono). * $p < 0.05$.

recompensa, respectivamente. Encontramos que la inactivación de la HbL no afectó la locomoción ni conductas relacionadas con la ansiedad (Figura 5c), evaluado a través de la distancia recorrida ($t_{(21)} = -0.25$, $p = 0.80$) y el número de cruces por el centro ($t_{(21)} = 0.49$, $p = 0.622$) en la prueba de campo abierto, y tampoco la búsqueda de recompensa (Figura 5d) evaluada a través del número de palanqueos por minuto para la obtención de comida apetitiva ($t_{(10)} = 0.04$, $p = 0.96$). Estos experimentos sugieren que la inactivación de la HbL no afecta la locomoción, el apetito, la motivación de exploración relacionada con la ansiedad, o la búsqueda de recompensa.

La inactivación de la HbL perjudica las respuestas defensivas durante la recuperación de la memoria de inhibición latente.

Los resultados descritos anteriormente direccionan la hipótesis de que más allá de que la HbL es un núcleo encargado de señalar eventos aversivos, es crucial para regular respuestas adaptativas en situaciones donde hay que evaluar cuál es la opción que conviene más. Así, nuestros resultados anteriores, sugieren que la inactivación de la HbL facilita una respuesta mediada por la memoria de seguridad cuando esta compite con una memoria de peligro; sin embargo, para tener certeza de que esto es así, decidimos cambiar el orden en la formación de las memorias (memoria de seguridad primero, luego la memoria de peligro) mediante el paradigma de inhibición latente (Figura 6A). Para esto, en el día 1, al grupo

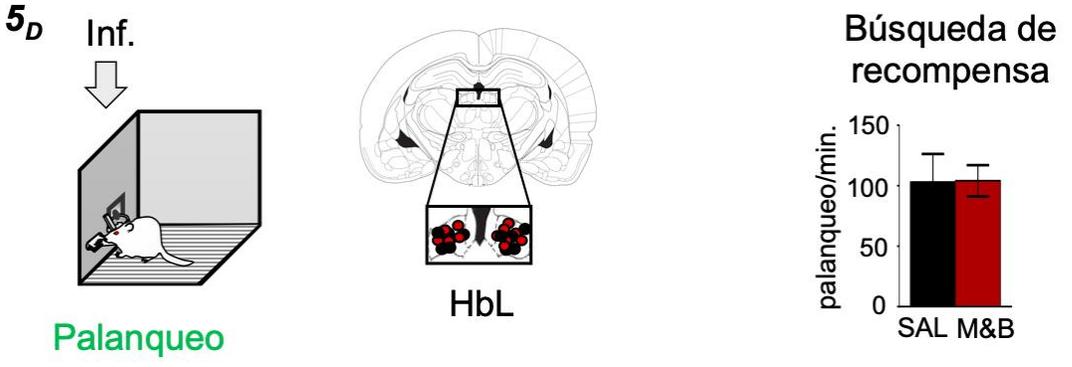
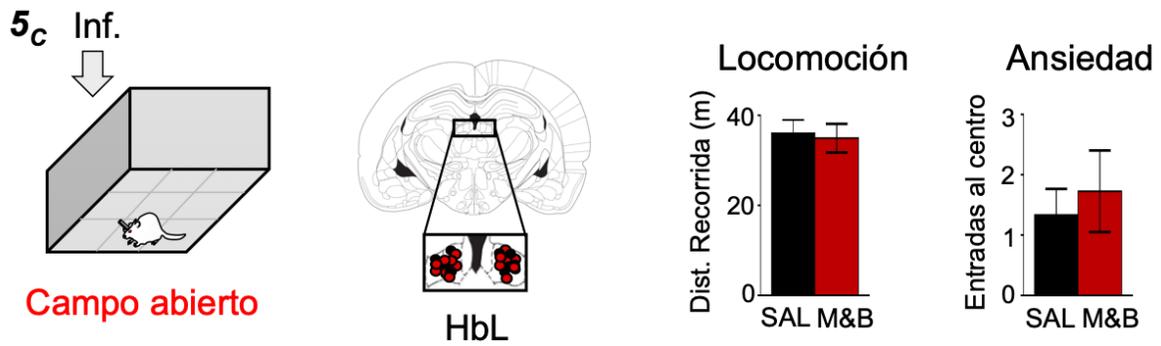
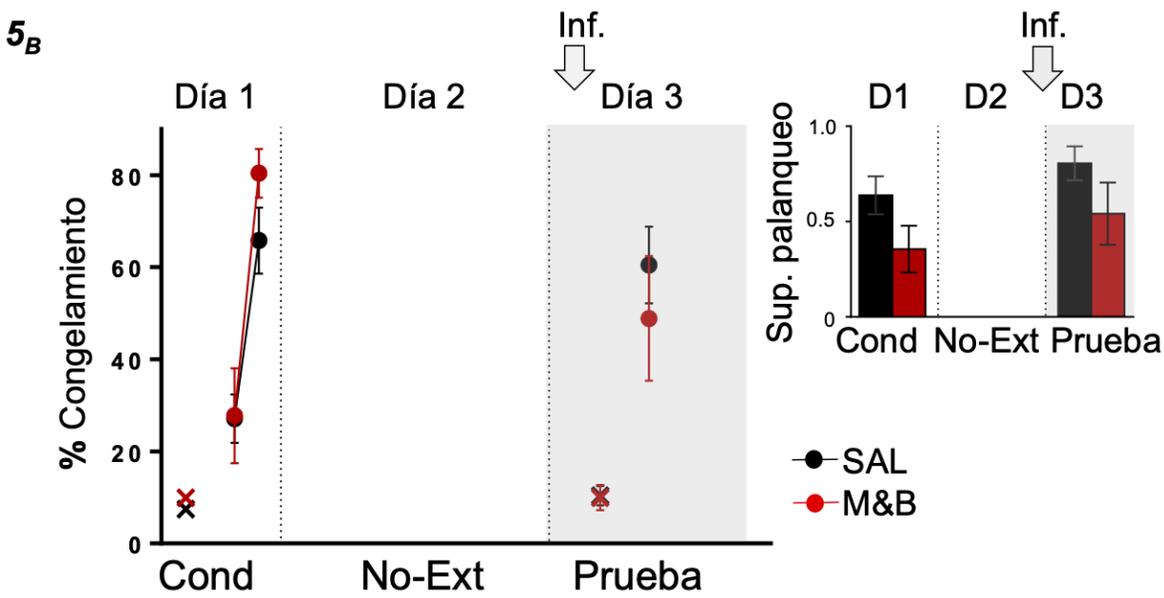
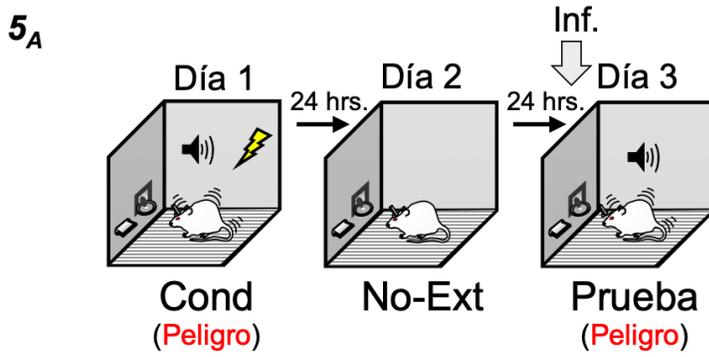


Figura 3.- El efecto de inactivación de la HbL es dependiente de la extinción y no es atribuible a alteraciones de locomoción u otros comportamientos emocionales motivados. **5_A**, Izquierda, Representación esquemática del entrenamiento de las ratas. Las ratas fueron entrenadas para asociar un tono con una descarga eléctrica (día 1; Cond, condicionamiento), lo que representa un aprendizaje de peligro (rojo). Un día después, las ratas fueron devueltas a la cámara de condicionamiento (día 2; No Ext, no extinción del tono). Al día siguiente, se les infundió a las ratas solución salina (SAL) o muscimol y baclofen (M&B) en la HbL (flecha gris) antes de presentarles sólo tonos (día 3, Prueba), lo que representa la recuperación de la memoria relacionada con el peligro (rojo). Derecha, dibujo coronal del atlas del cerebro de una rata que muestran la colocación de las puntas de los inyectores en la HbL. **5_B**, La inactivación de la HbL antes de la prueba de recuperación (día 3) sin extinción (flecha gris y área sombreada en el gráfico), no afectó las respuestas defensivas al tono, como indican los niveles similares de porcentaje de congelamiento provocada por el tono y la relación de supresión de palanqueo (recuadro: condicionamiento (último bloque de ensayos de dos tonos y prueba) entre los grupos control y experimental (SAL, n = 8; M&B, n = 6). Los datos se muestran como \pm SEM en bloques de dos tonos. Sup. Palanqueo, supresión de palanqueo; x, niveles de congelamiento en la línea base (antes del tono). **5_C**, Izquierda, representación esquemática de la tarea de campo abierto. En medio, dibujo coronal del atlas cerebral de una rata que muestra la colocación de las puntas de los inyectores en la HbL. Derecha, la inactivación de la HbL no afecta la locomoción ni el comportamiento relacionado con la ansiedad, como indican la distancia recorrida y el número de entradas al centro del campo, respectivamente (SAL, n = 12; M&B n = 11). **5_D**, Izquierda, representación esquemática del palanqueo. En medio, dibujo coronal del atlas del cerebro de una rata que muestran la colocación de las puntas de los inyectores en la HbL. Derecha, la inactivación de la HbL no afecta la conducta de búsqueda de recompensa, como indican similares números de palanqueo por minuto para obtener comida (SAL, n = 5; M&B n = 7). HbL, habénula lateral. Inf, infusión.

experimental de ratas se les entrenó presentándoles los tonos sin descarga eléctrica para la formación de la memoria de seguridad (Inhibición latente (IL)), mientras que al grupo control únicamente se les colocó dentro de las cajas por el mismo periodo de tiempo, pero sin la presentación del tono ni la descarga eléctrica (No-inhibición latente (No-IL)). En el día 2, a ambos grupos de ratas se le condicionó para que adquirieran la memoria de peligro. En el día 3, se hizo la prueba de memorias. Como se esperaba, según el paradigma de inhibición

latente, la pre-exposición al tono (grupo IL) provocó que estos animales tuvieran un retraso en la asociación del tono con la descarga eléctrica (Figura 6B) (primer bloque de tonos; congelamiento: No-IL: 22.30%; IL: 9.03%; $t_{(21)} = -2.16$, $p = 0.04$; supresión de palanqueo: No-IL: 0.32; IL: -0.15; $t_{(21)} = -2.64$, $p = 0.01$). Mientras que en el día 3, ambos grupos de animales respondieron con el mismo porcentaje de respuestas defensivas (congelamiento: $t_{(21)} = -0.33$, $p = 0.74$; supresión de palanqueo: $t_{(21)} = -0.98$, $p = 0.33$). Estos resultados sugieren que la inhibición latente mediada por la presentación del tono conduce a la formación de una memoria de seguridad que retrasa el aprendizaje del condicionamiento al tono. Una vez que tuvimos certeza de que podíamos generar una memoria de seguridad previa a la memoria de peligro, entonces evaluamos si la HbL era necesaria durante la competencia de memorias (seguridad, día 1 vs peligro, día 2). En el día 1, las ratas fueron pre-expuestas al tono sin descarga eléctrica. En el día 2, las ratas fueron condicionadas pareando cada tono con la descarga eléctrica. En el día 3, las ratas fueron infundidas con SAL o M&B dentro de la HbL para probar su participación en la prueba de memorias (Figura 6C). De forma similar a los resultados encontrados inactivando la HbL después del entrenamiento de extinción, previo a la prueba de memorias (Figura 4), observamos que la inactivación de la HbL durante la prueba, disminuye las conductas defensivas comparado con el grupo al que únicamente se le administró salina (Figura 6D); (día 3, congelamiento: SAL: 61.00%, M&B: 26.09%; $t_{(11)} = -2.80$, $p = 0.01$; supresión de palanqueo: SAL: 0.65%, M&B: 0.22%; $t_{(11)} = -2.25$, $p = 0.04$). Este resultado demuestra que la inactivación de la HbL impide la generación de respuestas defensivas, guiando la conducta hacia respuestas de seguridad y que esto es independiente de el orden en cómo se hayan formado (memoria de peligro antes que la memoria de seguridad o memoria de seguridad antes que la memoria de peligro). Con esto sabemos que la HbL es necesaria para promover conductas defensivas cuando dos memorias están en competencia.

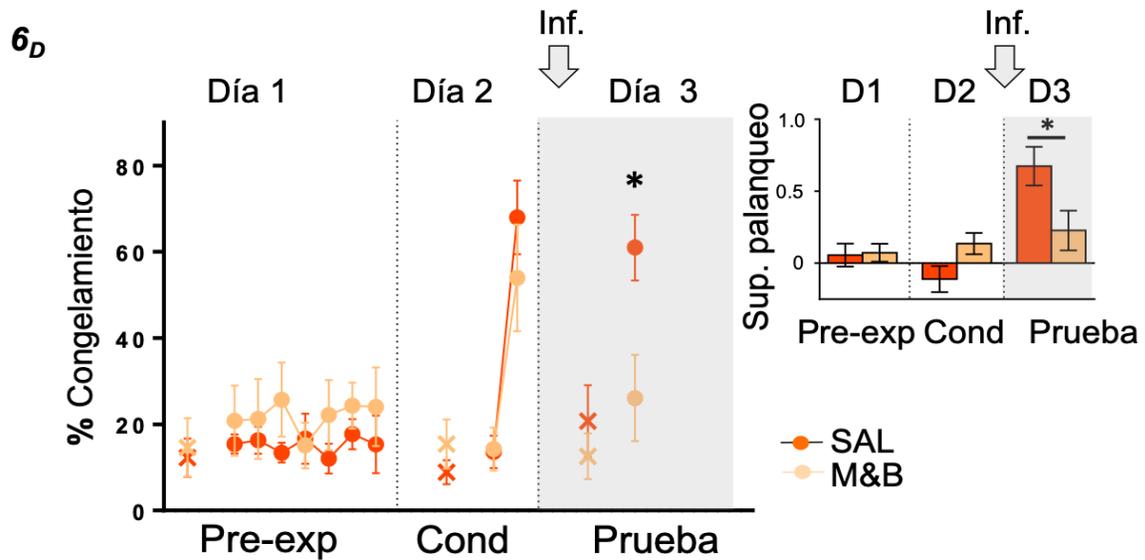
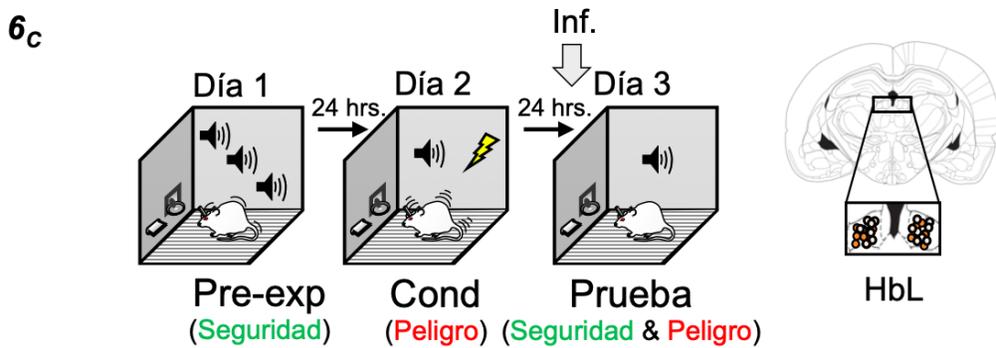
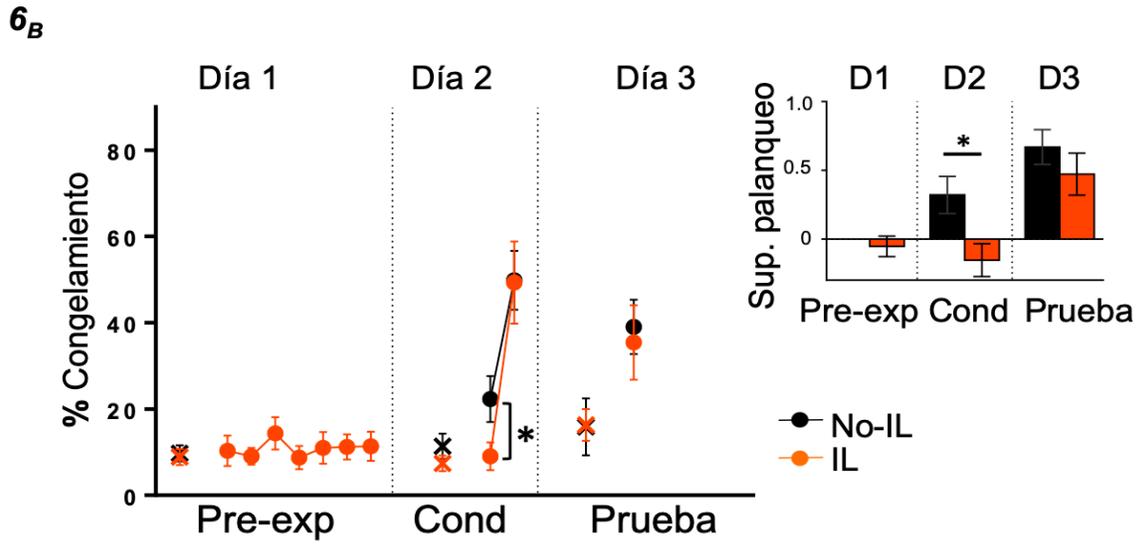
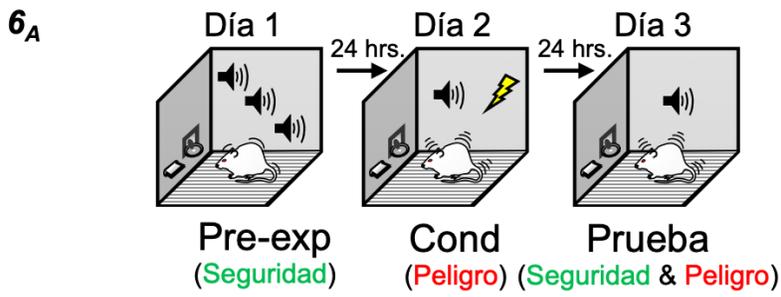


Figura 4.- La inactivación de la HbL antes de la prueba de memorias, tras la inhibición latente del tono, suprime las respuestas defensivas. 6A, Representación esquemática del entrenamiento de las ratas. Se les presentaron tonos sin descarga eléctrica (grupo de inhibición latente: IL), que representa el aprendizaje de seguridad (verde), o simplemente se les colocó en la caja de condicionamiento (grupo de no inhibición latente: No-IL; día 1; Pre-exp, pre-exposición). Un día después, ambos grupos fueron colocados en la misma caja conductual y entrenados para asociar un tono con la descarga eléctrica (día 2; Cond, condicionamiento), lo que representa un aprendizaje de peligro (rojo). Finalmente, al día siguiente, se les presentaron sólo tonos (día 3, Prueba), lo que implica la competencia de recuperación de memorias coexistentes de seguridad (verde) y amenaza (rojo) para controlar las respuestas defensivas. **6B,** La pre-exposición a los tonos debilitó el aprendizaje posterior de la memoria de peligro, como se indica por el menor porcentaje de congelamiento provocado por los tonos y la relación de supresión de palanqueo (recuadro: pre-exposición, condicionamiento y prueba) del grupo IL, en comparación con el grupo No-IL al comienzo del condicionamiento (No-IL, n = 11; IL, n = 12). **6C,** Izquierda, Representación esquemática del entrenamiento de las ratas. Las ratas fueron pre-expuestas a los tonos sin descarga eléctrica (día 1; Pre-exp, pre-exposición), lo que representa el aprendizaje de seguridad (verde). Un día después, las ratas fueron entrenadas para asociar el tono con la descarga eléctrica (día 2; Cond, condicionamiento), lo que representa el aprendizaje de peligro (rojo). Finalmente, al día siguiente, se infundió a las ratas solución salina (SAL) o muscimol y baclofen (M&B) en la HbL (flecha gris) antes de presentarles sólo tonos (día 3, Prueba), lo que implica la competencia de recuperación de memorias coexistentes de seguridad (verde) y amenaza (rojo) para controlar las respuestas defensivas. Derecha, dibujo coronal del atlas cerebral de una rata que muestran la colocación de las puntas de los inyectores en la HbL. **6D,** la inactivación de la HbL antes de la prueba de memorias (día 3), después de la inhibición latente y el condicionamiento (flecha gris y área sombreada en el gráfico), disminuyó las respuestas defensivas como se indica por los niveles más bajos de porcentaje de congelamiento provocada por el tono y la relación de supresión de palanqueo (recuadro: condicionamiento (último bloque de pruebas de dos tonos), extinción (primer bloque de tonos) y prueba) en el grupo experimental en comparación con el grupo control (SAL, n = 8; M&B, n = 5). Los datos se muestran como \pm SEM en bloques de dos tonos. HbL, habénula lateral. Inf, infusión. Sup. palanqueo, supresión de palanqueo; x, niveles de congelamiento de línea base (pretono). *p<0.05.

La inactivación de la HbL facilita la búsqueda de recompensa en lugar de promover conductas defensivas.

Más allá de respuestas adaptativas como la respuesta defensiva de congelamiento o evitación (Thornton and Bradbury, 1989; Tomaiuolo et al., 2014; Trusel et al., 2019), la HbL ha sido implicada en tareas conductuales más complejas como la toma de decisiones (Stopper and Floresco, 2014; Baker and Mizumori, 2017; Mathis et al., 2017). Así entonces, utilizando el paradigma de evitación mediada por la plataforma (EMP) (Bravo-Rivera et al., 2014; Diehl et al., 2019; Bravo-Rivera and Sotres-Bayon, 2020) probamos si la inactivación de la HbL podría facilitar la búsqueda de recompensa, o bien una respuesta de evitación cuando las ratas eran desafiadas a elegir entre evitar una descarga eléctrica quedándose en un lugar seguro (plataforma); o bien, ir en busca de la obtención de comida apetitiva como recompensa, desafiando el riesgo de recibir la descarga eléctrica. Después de entrenar a las ratas a palanquear para obtener comida durante cinco días, vino el entrenamiento de evitación: durante 10 días, las ratas fueron entrenadas a subir a una plataforma para evitar la descarga eléctrica que era señalizada por un tono (Figura 7A). Durante la primera etapa del entrenamiento de evitación (día 2), las ratas adquirieron una memoria de peligro al tono, demostrada por medio del congelamiento, pero muy poca respuesta de evitación, demostrada por el tiempo sobre la plataforma (Figura 7B; $t_{(28)} = 0.42$, $p = 0.67$) En contraste, en la última etapa del entrenamiento, la respuesta de congelamiento se mantuvo en un nivel similar a la primera fase (34.49% en día 2 vs. 44.71% en día 10; $t_{(28)} = -1.56$, $p = 0.12$), pero la respuesta de evitación aumentó dramáticamente (30.00% en día 2 vs. 83.33% en día 10; $t_{(28)} = -4.67$, $p < 0.00006$), indicado por niveles bajos de congelamiento pero un alto nivel de evitación (congelamiento: 44.71% y evitación: 83.333%; $t_{(28)} = -4.95$, $p < 0.000006$). Finalmente en el día 11, las ratas recibieron una infusión de SAL o M&B en la HbL y probamos qué elegían las ratas entre quedarse en la plataforma y evitar la descarga eléctrica, o tomar el riesgo de recibir la descarga eléctrica a cambio de ir en búsqueda de una recompensa. Observamos que la inactivación de la HbL durante la prueba de EMP impide la saliencia de respuestas defensivas, demostrado por una disminución de

congelamiento y tiempo en la plataforma (Figura 7C: congelamiento: SAL: 29.85%, M&B: 5.22%; $t_{(13)} = -2.73$, $p = 0.01$; Figura 7D: evitación SAL: 59.26%, M&B: 15.39%; $t_{(13)} = -3.00$, $p = 0.01$). Así mismo, observamos una tendencia en la disminución de la supresión de palanqueo, sin embargo ésta no fue significativa (Figura 7C recuadro: SAL: 0.63%, M&B: 0.25%; ($t_{(13)} = 1.85$, $p = 0.08$). Sin embargo, al realizar un análisis en bloques de 6 sec durante la presentación del tono evaluando el tiempo en la plataforma y la supresión de palanqueo, encontramos que la inactivación de la HbL impide la respuesta de evitación y la supresión de palanqueo (Figura 7E: tiempo en plataforma $F_{(1,13)}=7.50$, $p = 0.01$; comparación post hoc: -6 a -1 s, $p = 0.71$; 0-6 s, $p = 0.23$; 7-12 s, $p = 0.0048$; 13-18 s, $p = 0.0008$; 19-24 s, $p = 0.007$; 25-30 s, $p = 0.02$. recuadro, supresión de palanqueo $F_{(1,13)} = 6.55$, $p = 0.02$; comparación post hoc: 0-6 s, $p = 0.32$; 7-12 s, $p = 0.11$; 13-18 s, $p = 0.0042$, 19-24 s, $p = 0.03$; 25-30 s, $p = 0.44$). En resumen, la inactivación de la HbL, facilita la búsqueda de una recompensa cuando la rata tiene la oportunidad de elegir entre obtener una recompensa (a pesar del riesgo de recibir una descarga eléctrica) o quedarse en un lugar seguro (a pesar de no recibir una recompensa). Esto sugiere que la HbL es necesaria para facilitar respuestas defensivas sólo cuando una memoria de peligro y una de recompensa compiten.

Discusión

Dado que se ha descrito que la HbL se activa ante un estímulo aversivo y se inhibe ante un estímulo de recompensa, nos preguntamos en qué momento la HbL es necesaria para facilitar una respuesta defensiva ante un peligro. A través de inactivaciones farmacológicas y paradigmas conductuales, identificamos que la HbL es necesaria para facilitar una respuesta defensiva únicamente cuando dos memorias con valencia opuesta (peligro vs. seguridad/recompensa) coexisten. Este hallazgo se suma a la literatura que describe la relación de la HbL con respuestas aversivas motivadas; pero además, destaca el conflicto emocional (peligro vs. seguridad/recompensa) como una condición bajo la cual esta región del cerebro es crítica para promover respuestas defensivas.

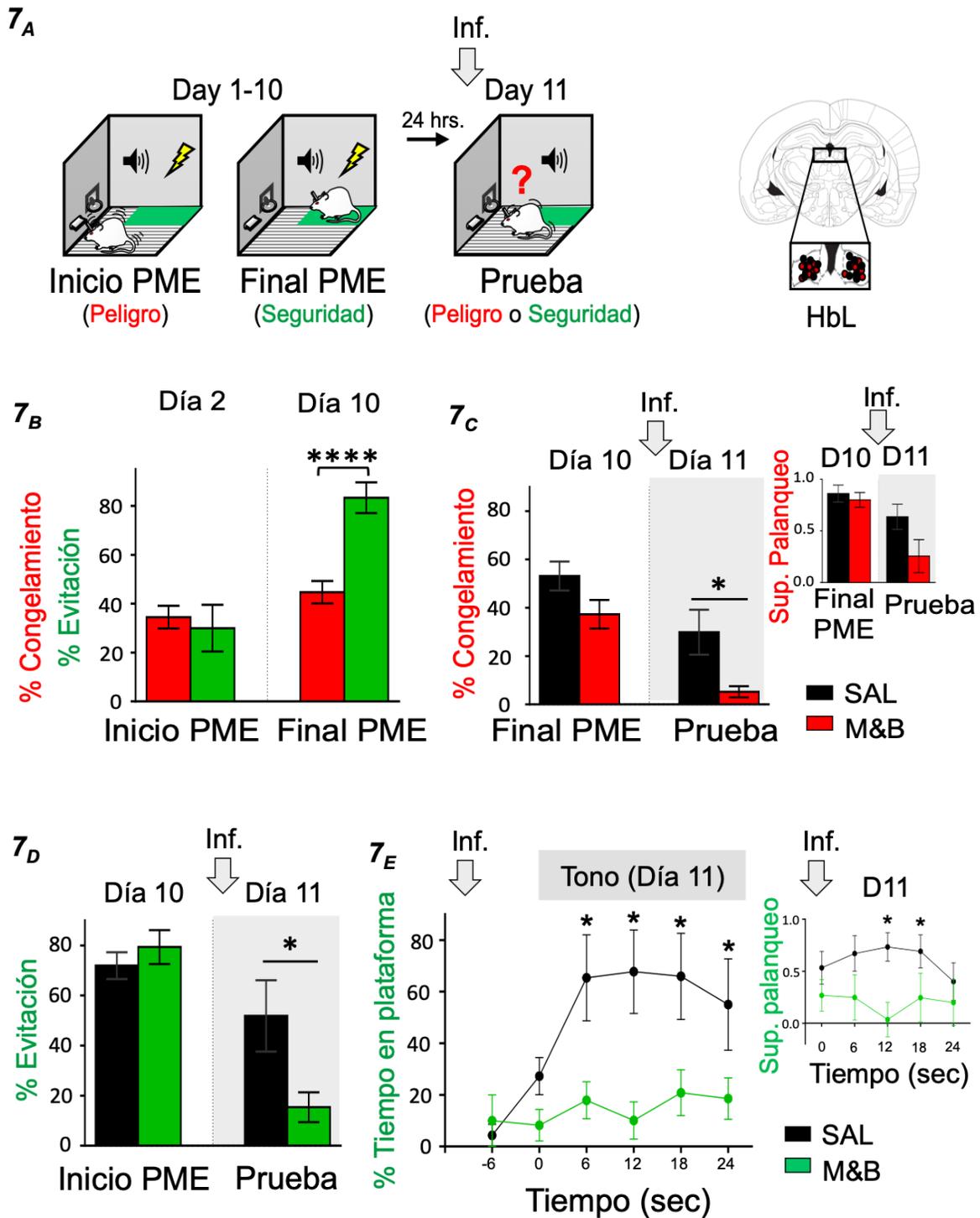


Figura 7.- La inactivación de la HbL antes de la prueba de memoria de evitación, mediada por la plataforma, sesga la conducta defensiva mediada por la elección hacia la búsqueda de recompensas. 7_A, Izquierda, Representación esquemática del entrenamiento de las ratas. Las ratas fueron

entrenadas para asociar el tono con las descargas eléctricas, así como para asociar el tono con el desplazamiento hacia una plataforma de seguridad para aprender a evitar la descarga (día 1-10; evitación mediada por plataforma (EMP)). La EMP temprana (día 2) representa el aprendizaje de peligro condicionado (rojo), mientras que la EMP tardía (día 10) representa el aprendizaje de seguridad mediado por la evitación instrumental (verde). Un día después, se infundió a las ratas solución salina (SAL) o muscimol y baclofen (M&B) en la HbL (flecha gris) antes de presentarles sólo tonos (día 11, Prueba), lo que implica la competencia de recuperación de las memorias coexistentes de peligro (rojo) y seguridad (verde) para controlar la conducta de elección. A la derecha, dibujo coronal del atlas del cerebro de una rata que muestran la colocación de las puntas de los inyectores en la HbL. **7B**, Durante el entrenamiento temprano de EMP (día 2), los niveles de congelamiento y evitación son similares. En cambio, durante el entrenamiento tardío de EMP (día 10), los niveles de evitación son mayores que los de congelamiento. Por lo tanto, los niveles de evitación aumentaron drásticamente con el entrenamiento de EMP, mientras que los niveles de congelamiento siguen siendo similares (n = 15). **7C**, la inactivación de la HbL antes de la prueba de PMA (flecha gris y área sombreada en el gráfico), perjudicó la recuperación de la memoria de EMP, como indica el menor porcentaje de respuestas de congelamiento provocado por el tono (pero no la proporción de supresión de palanqueo) del grupo experimental en comparación con el grupo control (SAL n = 7; M&B = 8). **7D**, La inactivación de la HbL antes de la prueba de EMP (flecha gris) sesgó la evitación mediada por la elección hacia el comportamiento de búsqueda de recompensa, como indica el menor porcentaje de evitación provocada por el tono (**7D**) y el tiempo de permanencia en la plataforma (**7E**), así como el menor índice de supresión de palanqueo (recuadro) en el grupo experimental en comparación con el grupo control (SAL n = 7; M&B = 8). Los datos se muestran como \pm SEM en bloques de dos tonos en B, C y D y en intervalos de 6 s en E. HbL, habénula lateral. Inf, infusión. Sup palanqueo, supresión de palanqueo; **** p<0.00001; *p<0.05.

La HbL promueve estrategias defensivas únicamente durante la competencia de memorias de peligro/seguridad.

La técnica más utilizada para extinguir una respuesta defensiva ante un estímulo, es la presentación de dicho estímulo pero sin la consecuencia negativa; sin embargo, se sabe que aún después de esta extinción, la memoria de peligro regresa con el paso del tiempo (Rescorla, 2004; Sotres-Bayon et al., 2006), y que un solo día es suficiente para que esto ocurra (Quirk, 2002a). Así mismo,

utilizando la técnica de c-fos como marcador de actividad neuronal, se ha demostrado que la actividad de la HbL tiene una correlación positiva con el regreso de la memoria de peligro (Martínez-Canabal et al., 2019). En esta misma línea, nosotros encontramos que la inactivación de la HbL, después de un entrenamiento de extinción, previene el regreso de la respuestas defensiva. En conjunto, estos resultados demuestran que la HbL no sólo se recluta durante el regreso de una memoria peligrosa, sino que es necesaria para facilitar la memoria de peligro por encima de la memoria de extinción, facilitando así una conducta defensiva.

La mayoría de las proyecciones de la HbL son enviadas hacia núcleos encargados que facilitan respuestas conductuales apetitivas (Kim, 2009). Estas proyecciones inhiben la actividad de dichos núcleos. Dicha inhibición podría estar inhibiendo la memoria de seguridad/extinción y facilitando la memoria de peligro. Estudios recientes encontraron que la activación optogenética de neuronas dopaminérgicas dentro del área tegmental ventral (ATV) facilitan la memoria de extinción (Salinas-Hernández et al., 2018; Cai et al., 2020). Otro estudio reciente demostró que la inhibición quimiogénica de la actividad serotoninérgica del rafe dorsal que recibe proyecciones de la HbL, facilita la resiliencia en animales durante condiciones aversivas (Varga et al., 2003; Andalman et al., 2019). Dado que la actividad de la HbL es capaz de suprimir la actividad de estructuras encargadas de liberar dopamina y serotonina (Varga et al., 2003; Matsumoto and Hikosaka, 2007; Lammel et al., 2012; Andalman et al., 2019), entonces es posible que al suprimir la actividad de la HbL, se facilite la actividad de las vías monoaminérgicas y así la memoria de seguridad (extinción e inhibición latente) y resiliencia en condiciones aversivas. En esta misma línea, nosotros proponemos que la actividad de la HbL podría estar suprimiendo la actividad del ATV para impedir la recuperación de la memoria de seguridad, facilitando la memoria de peligro y así guiar una respuesta defensiva. Esto es consistente con trabajos previos en los que han demostrado que la actividad de la HbL facilita una respuesta aversiva (Shabel et al., 2019). Así mismo, la inhibición de la actividad de

la HbL por medio de ketamina, facilita respuestas antidepresivas en los animales (Yang et al., 2018; Cui et al., 2019) y la disminución de la actividad de la HbL dada por el aumento de neurogénesis, previene la recuperación de la memoria de peligro (Martínez-Canabal et al., 2019). Con todo esto, nosotros sugerimos que al suprimir la actividad de la HbL, ya sea por medio de una inactivación farmacológica o por el aumento de neurogénesis, la expectativa de recibir un estímulo aversivo (peor de lo que se esperaba) también se ve suprimida (posiblemente dado por la desinhibición de las vías monoaminérgicas relacionadas con respuestas conductuales motivadas), permitiendo así que los animales puedan explorar otras opciones como aproximarse a donde haya comida cuando esta está disponible.

La extinción nos permite evaluar de qué manera la memoria de peligro y la memoria de seguridad coexisten y cómo compiten para facilitar o impedir una respuesta defensiva (Myers and Davis, 2002; Quirk, 2002b; Rescorla, 2004; Herry et al., 2006; Quirk and Mueller, 2008; Martínez-Canabal et al., 2019). Nuestros resultados demuestran que la HbL es una estructura crítica para promover una respuesta defensiva, facilitando una memoria de peligro, durante el conflicto de memorias entre la memoria de peligro y de seguridad. Esta interpretación es consistente con la idea de que la HbL está relacionada con respuestas motivadas dadas por estímulos aversivos y de recompensa (Wang et al., 2017). Así, nuestros hallazgos sugieren que la actividad de la HbL promueve respuestas defensivas en condiciones donde existe otra memoria opuesta que compite por controlar la conducta del animal. Siguiendo esta línea, otra manera de comprobar que la última afirmación es cierta, fue cambiando el orden de las memorias y luego probar si la HbL era necesaria durante el conflicto de memorias para facilitar una conducta defensiva; Para esto, utilizamos el paradigma de inhibición latente. Con esto identificamos que el orden en cómo se crean las memorias no es relevante para que la actividad de la HbL facilite una respuesta defensiva ante un conflicto emocional de memorias (peligro vs seguridad o seguridad vs peligro). Por lo tanto, estos resultados indican que la HbL puede no mediar en la recuperación de

respuestas defensivas extinguidas per se, sino más bien en la promoción de comportamientos relacionados con la amenaza en eventos de recuperación que implican la competencia de memorias de peligro y seguridad.

La HbL promueve respuestas defensivas durante una prueba de elección guiada por un conflicto

Nuestros hallazgos durante la prueba en el EMP en el que identificamos que la inactivación de la HbL facilita la búsqueda de una recompensa al mismo tiempo que impide una respuesta de evitación, es consistente con estudios previos en los que identificaron que la HbL es necesaria para el aprendizaje de evitación (Wilcox et al., 1986; Thornton and Bradbury, 1989). Sin embargo, nuestro EMP difiere de una prueba tradicional de evitación dado que en EMP, los animales deben seleccionar una acción en la que hay un conflicto emocional (evitar un estímulo aversivo o acercarse a uno gratificante) (Bravo-Rivera et al., 2014; Diehl et al., 2019; Bravo-Rivera and Sotres-Bayon, 2020). Durante el entrenamiento del EMP, la plataforma adquiere una valencia emocional positiva (seguridad), mientras que las barras adquieren una valencia negativa (peligro). Luego, durante la prueba (en la que ya no se presenta la descarga eléctrica) los animales son sometidos para que decidan, guiados por recuerdos emocionales competitivos señalados por un tono, si quedarse en la plataforma segura o ir a presionar la palanca para obtener comida. Normalmente, las ratas eligen evitar la descarga quedándose en la plataforma, sin embargo, las ratas a las que se les inactivó la HbL elegían ir a presionar la palanca para obtener comida a pesar de la amenaza de recibir la descarga eléctrica. Este resultado sugiere que la HbL es necesaria para detener la búsqueda de alimento y promover una respuesta defensiva durante un conflicto de elección guiado por memorias con valencias emocionales opuestas (peligro vs seguridad). Reportes previos han descrito que es necesaria la actividad de las neuronas dopaminérgicas para facilitar una respuesta de evitación (Oleson et al., 2012). La HbL inhibe la actividad de las neuronas dopaminérgicas del ATV, a través de la activación de las neuronas GABA localizadas en la punta de esta estructura (área rostromedial tegmental ventral) promoviendo así respuestas

defensivas poniendo un freno a la conducta de búsqueda de recompensas (Jhou et al., 2009; Quirk and Sotres-Bayon, 2009; Proulx et al., 2018). La inactivación farmacológica en nuestros experimentos podría estar facilitando la desinhibición de las neuronas dopaminérgicas del ATV para así facilitar la búsqueda de recompensas haciendo así que los animales adquieran una conducta mas arriesgada. Esto es consistente con hallazgos previos en los que identificaron que al inactivar la HbL, los animales tomaban decisiones más arriesgadas en una prueba de obtención de recompensas (Stopper and Floresco, 2014) y la noción de que la HbL está implicada en la facilitación de respuestas conductuales asociadas a la supervivencia (Matsumoto and Hikosaka, 2009; Baker and Mizumori, 2017). Así, nuestros hallazgos en EMP, demuestran que la HbL es una estructura crítica para guiar una conducta motivada mediada por la toma de decisiones, basada en experiencias previas; asimismo, destaca su participación fundamental en la promoción de estrategias de comportamiento defensivo durante la conducta de elección mediada por el conflicto.

La HbL como un nodo integrador de información aversiva y apetitiva

La HbL es una estructura que recibe información de muchas estructuras que han sido relacionadas con respuestas conductuales motivadas. Se ha descrito que la PL es necesaria para generar respuestas defensivas guiadas por un estímulo condicionado (Sierra-Mercado et al., 2011), al mismo tiempo, la HbL recibe proyecciones de manera directa de la PL (Kim and Lee, 2012). Además, estudios recientes han demostrado que la conexión entre la PL y la HbL es necesaria para desarrollar un nuevo aprendizaje con base en uno existente (flexibilidad cognitiva) (Mathis et al., 2017). Esto resalta la posibilidad de que la activación del circuito HbL-PL pudiera estar facilitando una conducta defensiva cuando una memoria de peligro y una de seguridad coexisten generando un conflicto. En este mismo sentido se ha descrito que la actividad del globo pálido está relacionada con la elección de una conducta motivada (Hong and Hikosaka, 2008). Se ha descrito que este núcleo tiene una actividad opuesta a la HbL, es decir, durante un estímulo aversivo la actividad de este núcleo se inhibe, por el contrario, al

presentar un estímulo gratificante, su actividad aumenta. Este núcleo envía proyecciones de manera directa a la HbL, de tal forma que la actividad de la HbL podría estar mediada por las aferencias del globo pálido (Stephenson-Jones et al., 2016, 2020). Como se ha comentado antes, la HbL envía proyecciones hacia el ATV, sin embargo, por medio de un pequeño grupo de neuronas que proyecta directamente al ATV, este también es capaz de inhibir la actividad de la HbL durante la entrega de una recompensa (Stamatakis et al., 2013). Sugiere que la HbL es un núcleo fundamental dentro de un circuito encargado de señalar estímulos aversivos y de recompensa, para así facilitar respuestas conductuales defensivas o de aproximación a dichos estímulos.

Conclusión

En conjunto, nuestro estudio revela que el conflicto dado por una memoria emocional, es una condición de supervivencia fundamental bajo la cual la HbL es necesaria para promover estrategias defensivas. Esta conclusión es coherente con la nueva propuesta de que la HbL actúa como un nodo crítico en el control de respuestas emocionales guiadas por eventos aversivos, mediado por la regulación de las estructuras dopaminérgicas y serotoninérgicas del cerebro medio (Hu et al., 2020). Por lo tanto, nosotros proponemos que durante el conflicto emocional, la actividad de la HbL es necesaria para sesgar el comportamiento emocional dependiente de la experiencia hacia respuestas conductuales defensivas y alejadas del comportamiento de búsqueda de recompensa, probablemente mediante la supresión de las estructuras implicadas en los comportamientos motivados por el apetito. En consecuencia, la falta de actividad en la HbL durante el conflicto emocional resulta en un cambio, facilitando la conducta de búsqueda de recompensa e impidiendo la respuesta defensiva, probablemente a través de la desinhibición de las estructuras involucradas en los comportamientos motivados por el apetito (Figura 8). La identificación de las regiones cerebrales integradas en una red compleja que son necesarias para las respuestas conductuales mediadas por el conflicto, puede ser clave para entender cómo el cerebro equilibra la información sobre las memorias emocionales que compiten entre sí para regular la

conducta emocional y así facilitar respuestas adaptativas que ayuden a la supervivencia. Esto es congruente con nuestra hipótesis inicial dado que la HbL es necesaria para la facilitación de conductas defensivas, pero únicamente cuando esta memoria está en competencia con otra memoria opuesta.

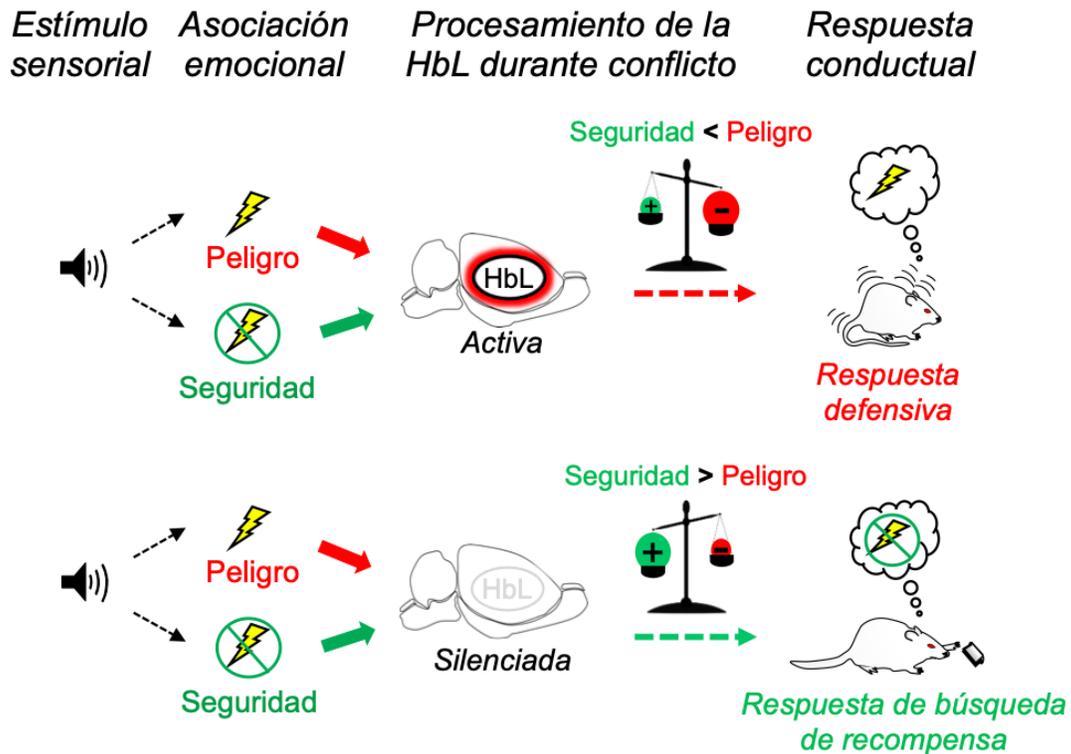


Figura 8.- Modelo propuesto para la participación del HbL durante la recuperación de recuerdos conflictivos de amenaza y seguridad. Normalmente (arriba), la HbL utiliza la información sobre asociaciones emocionales en conflicto (memorias coexistentes de peligro (rojo) y de seguridad (verde)) para permitir la promoción de la expresión predominante de respuestas defensivas provocadas por estímulos (por ejemplo, el tono) sobre los comportamientos de búsqueda de recompensa. El silenciamiento de la actividad de la HbL durante el conflicto de la recuperación de una memoria emocional (abajo) impide que esta región del cerebro señale el peligro, lo que da lugar a un cambio en el equilibrio de los comportamientos emocionales dependientes de la experiencia hacia comportamientos de búsqueda de recompensa y alejados de las respuestas defensivas

Apéndice

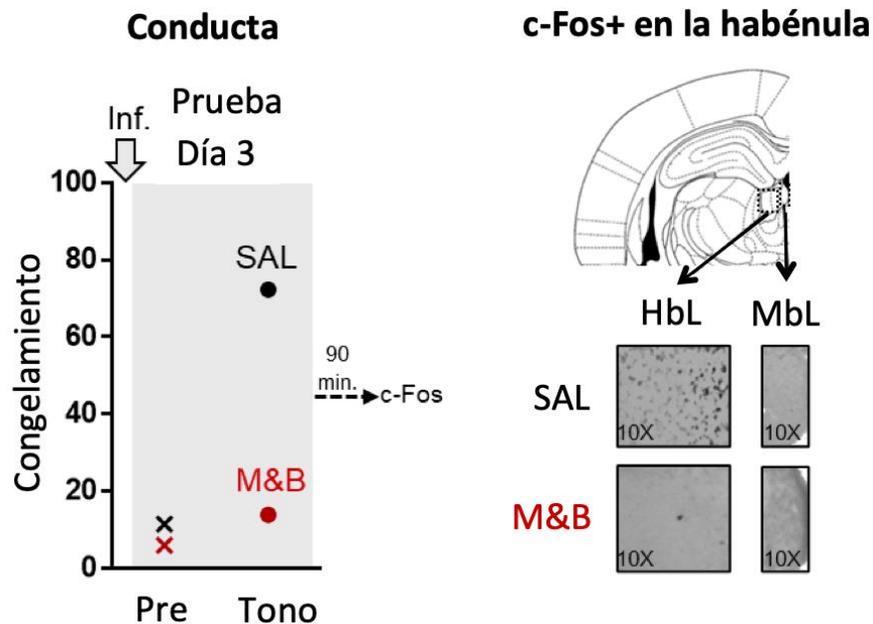
La habénula lateral y no la habénula medial facilita respuestas defensivas únicamente cuando las memorias de peligro y seguridad están en conflicto

En nuestro experimento inactivando la HbL durante la competencia de memorias (día 3) demostramos que la disminución de las respuestas defensivas era exclusivo de la inactivación en la HbL y no de áreas circundantes. Sin embargo, para demostrar que este efecto era exclusivo del área lateral y no de la habénula medial (HbM); realizamos un experimento piloto en el que infundimos SAL (n = 1) o M&B (n = 1) en la HbL en el día 3 del experimento y 90 minutos después de la presentación del último tono sacrificamos a las ratas para evaluar la expresión de c-fos tanto en el área medial como en la lateral. Observamos que después de la infusión de SAL, la HbL es fuertemente reclutada durante la recuperación de la memoria de extinción (día 3), mientras que la HbM no lo es (Figura apéndice. 1). Este resultado es consistente con un estudio anterior que muestra el reclutamiento de la HbL durante la recuperación de una memoria de peligro extinguida (Martínez-Canabal et al., 2019), y sugiere que la HbM no participa en la recuperación de la memoria de extinción. En contraste, encontramos que la inactivación por medio de M&B silenció el reclutamiento de la HbL, mientras que la expresión de c-Fos en la HbM no cambió. Así, aunque no podemos descartar directamente la propagación de las infusiones a la HbM, los resultados de nuestro experimento piloto sugieren que las inactivaciones silenciaron específicamente la actividad mediada por la recuperación de la extinción de la HbM. Esto también apoya la conclusión de que la dosis y el volumen utilizado en este estudio y un estudio anterior (Stopper & Floresco 2014) es suficiente para inactivar únicamente la HbL.

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se realizó como se describe en el artículo de Martínez-Canabal et. al. (2019). De forma breve, los animales fueron sacrificados 90 minutos después del último tono de la prueba de competencia de memorias (día 3), luego fueron perfundidos con solución salina (0.9 %) y paraformaldehído (PFA

4 %) para fijar los cerebros. Posteriormente estos fueron colectados y se mantuvieron en PFA por tres días, luego se cambiaron a sacarosa (30 %) para crioprotger el tejido. Cuatro días después los cerebros fueron cortados a 45 μ m, cada sección se mantuvo en anticongelante (40 % glicerol, 10 etilen glicol en PBS). En el primer día de inmunohistoquímica se realizó la recuperación de antígenos a través de una solución de citratos (citrato cítrico 10 mM, tween 20, pH 6,0), luego utilizamos una olla de presión por 20 minutos. Luego se realizó el bloqueo de peroxidasas (peróxido de hidrógeno al 3 %) endógenas por diez minutos y luego se colocaron en una solución de bloqueo (albúmina de suero bovino, 1%, Santa Cruz Biotechnology, NGS 1%, Jackson Immunoresearch en TBS-T) por una hora. A continuación los tejidos se transfirieron al anticuerpo primario (1:2500, anti c-Fos, Ab-5, conejo policlonal, Millipore/Calbiochem, Cell Signaling Technology) durante 48 horas. Para el segundo día, las secciones fueron lavadas con TBS-T por diez minutos, luego fueron incubadas en el complejo ABC (1:250) (kit ABC-peroxidasa, elite VECTASAN, Vector) durante 1 hora. Luego se volvió a lavar el tejido y se utilizó una solución de DAB-Ni como cromógeno formando una precipitación púrpura que nos permitió identificar las células activadas durante la prueba.



Referencias

- Amaral DG (2003) The Amygdala, Social Behavior, and Danger Detection. In: Annals of the New York Academy of Sciences.
- Amo R, Fredes F, Kinoshita M, Aoki R, Aizawa H, Agetsuma M, Aoki T, Shiraki T, Kakinuma H, Matsuda M, Yamazaki M, Takahoko M, Tsuboi T, Higashijima S, Miyasaka N, Koide T, Yabuki Y, Yoshihara Y, Fukai T, Okamoto H (2014) The habenulo-raphe serotonergic circuit encodes an aversive expectation value essential for adaptive active avoidance of danger. *Neuron* 84:1034-1048.
- Anagnostaras SG, Gale GD, Fanselow MS (2001) Hippocampus and contextual fear conditioning: Recent controversies and advances. *Hippocampus*. 11(1):8-17.
- Andalman AS, Burns VM, Lovett-Barron M, Broxton M, Poole B, Yang SJ, Grosenick L, Lerner TN, Chen R, Benster T, Mourrain P, Levoy M, Rajan K, Deisseroth K (2019) Neuronal Dynamics Regulating Brain and Behavioral State Transitions. *Cell*. 177:970-985 e920.
- Baker PM, Mizumori SJY (2017) Control of behavioral flexibility by the lateral habenula. *Pharmacol Biochem Behav*. 162:62-68.
- Bendesky A, Bargmann CI (2011) Genetic contributions to behavioural diversity at the gene-environment interface. *Nat Rev Genet*. 8;12:809-20.
- Berman DE, Dudai Y (2001) Memory extinction, learning anew, and learning the new: Dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science* 291(5512):2417-9.
- Blair HT, Sotres-Bayon F, Moita MAP, Ledoux JE (2005) The lateral amygdala processes the value of conditioned and unconditioned aversive stimuli. *Neuroscience* 133(2):561-9.
- Blanchard RJ, Blanchard DC (1971) Defensive reactions in the albino rat. *Learn Motiv*. 2, 351-362.
- Bravo-Rivera C, Roman-Ortiz C, Brignoni-Perez E, Sotres-Bayon F, Quirk GJ (2014) Neural structures mediating expression and extinction of platform-mediated avoidance. *J Neurosci*. 34:9736-9742.
- Bravo-Rivera C, Sotres-Bayon F (2020) From Isolated Emotional Memories to Their Competition During Conflict. *Front Behav Neurosci*. 14:36.
- Cai LX, Pizano K, Gundersen GW, Hayes CL, Fleming WT, Holt S, Cox JM, Witten IB (2020) Distinct signals in medial and lateral VTA dopamine neurons modulate fear extinction

at different times. *Elife*. 9:e54936.

Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ (2002) Emotion and motivation: The role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev*. 26:321-352.

Cascardi M, Armstrong D, Chung L, Paré D (2015) Pupil Response to Threat in Trauma-Exposed Individuals With or Without PTSD. *J Trauma Stress*. (4):370-4.

Chang C hui, Maren S (2010) Strain difference in the effect of infralimbic cortex lesions on fear extinction in rats. *Behav Neurosci*. 124(3):391-7.

Concha ML, Wilson SW (2001) Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *J Anat*. 49:647-72.

Constantinou E, Purves KL, McGregor T, Lester KJ, Barry TJ, Treanor M, Craske MG, Eley TC (2021) Measuring fear: Association among different measures of fear learning. *J Behav Ther Exp Psychiatry*. 70:101618.

Cui Y, Hu S, Hu H (2019) Lateral Habenular Burst Firing as a Target of the Rapid Antidepressant Effects of Ketamine. *Trends Neurosci*. 42:179-191.

Darvas M, Fadok JP, Palmiter RD (2011) Requirement of dopamine signaling in the amygdala and striatum for learning and maintenance of a conditioned avoidance response. *Learn Mem*. 18(3):136-43.

Darwin C (2013) *The Expression of the Emotions in Man and Animals*. University of Chicago press.

Diehl MM, Bravo-Rivera C, Quirk GJ (2019) The study of active avoidance: A platform for discussion. *Neurosci Biobehav Rev*. 107:229-237.

Do-Monte FH, Manzano-Nieves G, Quiñones-Laracuente K, Ramos-Medina L, Quirk GJ (2015) Revisiting the role of infralimbic cortex in fear extinction with optogenetics. *J Neurosci*. 35:3607-15.

Falls WA, Miserendino MJD, Davis M (1992) Extinction of fear-potentiated startle: Blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *J Neurosci*. 12:854-63.

Flood JF, Jarvik ME, Bennett EL, Orme AE, Rosenweig MR (1977) Protein synthesis inhibition and memory for pole jump active avoidance and extinction. *Pharmacol Biochem Behav*. 7:71-7.

- Fowler CD, Lu Q, Johnson PM, Marks MJ, Kenny PJ (2011) Habenular $\alpha 5$ nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. *Nature*. 471:597-601.
- Frahm S, Ślimak MA, Ferrarese L, Santos-Torres J, Antolin-Fontes B, Auer S, Filkin S, Pons S, Fontaine JF, Tsetlin V, Maskos U, Ibañez-Tallon I (2011) Aversion to Nicotine Is Regulated by the Balanced Activity of $\beta 4$ and $\alpha 5$ Nicotinic Receptor Subunits in the Medial Habenula. *Neuron*. 70:522-35.
- Helmstetter FJ, Bellgowan PS (1994) Effects of muscimol applied to the basolateral amygdala on acquisition and expression of contextual fear conditioning in rats. *Behav Neurosci*. 108:1005-9.
- Herry C, Trifilieff P, Micheau J, Lüthi A, Mons N (2006) Extinction of auditory fear conditioning requires MAPK/ERK activation in the basolateral amygdala. *Eur J Neurosci*. 24:261-9.
- Hong S, Hikosaka O (2008) The Globus Pallidus Sends Reward-Related Signals to the Lateral Habenula. *Neuron*. 60:720-9.
- Hu H, Cui Y, Yang Y (2020) Circuits and functions of the lateral habenula in health and in disease. *Nat Rev Neurosci*. 21:277-295.
- Jhou TC, Fields HL, Baxter MG, Saper CB, Holland PC (2009) The Rostromedial Tegmental Nucleus (RMTg), a GABAergic Afferent to Midbrain Dopamine Neurons, Encodes Aversive Stimuli and Inhibits Motor Responses. *Neuron*. 61:786-800.
- Kim U (2009) Topographic commissural and descending projections of the habenula in the rat. *J Comp Neurol*. 513:173-87.
- Kim U, Lee T (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*. 35:1253-1269.
- Koob GF, Dantzer R, Bluthé RM, Lebrun C, Bloom FE, Le Moal M (1986) Central injections of arginine vasopressin prolong extinction of active avoidance. *Peptides*. 7:213-8.
- Lammel S, Lim BK, Ran C, Huang KW, Betley MJ, Tye KM, Deisseroth K, Malenka RC (2012) Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature*. 491:212-217.
- Lázaro-Muñoz G, LeDoux JE, Cain CK (2010) Sidman Instrumental Avoidance Initially Depends on Lateral and Basal Amygdala and Is Constrained by Central Amygdala-Mediated Pavlovian Processes. *Biol Psychiatry*. 67:1120-7.

- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci.* 23:155-184.
- LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ (1988) Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J Neurosci.* 7:2517-29.
- LeDoux JE, Romanski L, Xagoraris A (1989) Indelibility of subcortical emotional memories. *J Cogn Neurosci.* 1:238-43.
- LeDoux JE, Sakaguchi A, Iwata J, Reis DJ (1986) Interruption of projections from the medial geniculate body to an archi-neostriatal field disrupts the classical conditioning of emotional responses to acoustic stimuli. *Neuroscience.* 17:615-27.
- Maren S (1999) Neurotoxic basolateral amygdala lesions impair learning and memory but not the performance of conditional fear in rats. *J Neurosci.* 19:8696-703.
- Maren S, Aharonov G, Fanselow MS (1996) Retrograde abolition of conditional fear after excitotoxic lesions in the basolateral amygdala of rats: Absence of a temporal gradient. *Behav Neurosci.* 110:718-26.
- Martínez-Canabal A, López-Oropeza G, Gaona-Gamboa A, Ballesteros-Zebadua P, de la Cruz OG, Moreno-Jimenez S, Sotres-Bayon F (2019) Hippocampal neurogenesis regulates recovery of defensive responses by recruiting threat- and extinction-signalling brain networks. *Sci Rep.* 9:2939.
- Mathis V, Barbelivien A, Majchrzak M, Mathis C, Cassel JC, Lecourtier L (2017) The Lateral Habenula as a Relay of Cortical Information to Process Working Memory. *Cereb Cortex.* 162:69-78.
- Matsumoto M, Hikosaka O (2007) Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature.* 447:1111-1115.
- Matsumoto M, Hikosaka O (2009) Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. *Nat Neurosci.* 12:77-84.
- Milad MR, Quirk GJ (2002) Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature.* 420:70-4.
- Milad MR, Quirk GJ (2012) Fear Extinction as a Model for Translational Neuroscience: Ten Years of Progress. *Annu Rev Psychol.* 63:129-51.
- Morgan MA, Romanski LM, LeDoux JE (1993) Extinction of emotional learning: Contribution of medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett.* 163:109-13.

- Moscarello JM, LeDoux JE (2013) Active avoidance learning requires prefrontal suppression of amygdala-mediated defensive reactions. *J Neurosci.* 33:3815-23.
- Muller J, Corodimas KP, Fridel Z, LeDoux JE (1997) Functional inactivation of the lateral and basal nuclei of the amygdala by muscimol infusion prevents fear conditioning to an explicit conditioned stimulus and to contextual stimuli. *Behav Neurosci.* 111:683-91.
- Myers KM, Davis M (2002) Systems-level reconsolidation: Reengagement of the hippocampus with memory reactivation. *Neuron.* 36:567-584.
- Oleson EB, Gentry RN, Chioma VC, Cheer JF (2012) Subsecond dopamine release in the nucleus accumbens predicts conditioned punishment and its successful avoidance. *J Neurosci.* 32:14804-14808.
- Pavlov IP (2010) Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. *Ann Neurosci.* 17:136-41.
- Pendyam S, Bravo-Rivera C, Burgos-Robles A, Sotres-Bayon F, Quirk GJ, Nair SS (2013) Fear signaling in the prelimbic-amygdala circuit: A computational modeling and recording study. *J Neurophysiol.* 110(4):844-61
- Price RB, Siegle GJ, Silk JS, Ladouceur C, McFarland A, Dahl RE, Ryan ND (2013) Sustained neural alterations in anxious youth performing an attentional bias task: A pupillometry study. *Depress Anxiety.* 30:22-30.
- Proulx CD, Aronson S, Milivojevic D, Molina C, Loi A, Monk B, Shabel SJ, Malinow R (2018) A neural pathway controlling motivation to exert effort. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 115:5792-5797.
- Quirk GJ (2002) Memory for extinction of conditioned fear is long-lasting and persists following spontaneous recovery. *Learn Mem.* 9:402-407.
- Quirk GJ, Mueller D (2008) Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology.* 33:56-72.
- Quirk GJ, Russo GK, Barron JL, Lebron K (2000) The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished fear. *J Neurosci.* 20:6225-6231.
- Quirk GJ, Sotres-Bayon F (2009) Signaling Aversive Events in the Midbrain: Worse than Expected. *Neuron.* 61:655-656.
- Rescorla RA (2004) Spontaneous recovery. *Learn Mem.* 11:501-509.

- Rodriguez-Romaguera J, Sotres-Bayon F, Mueller D, Quirk GJ (2009) Systemic Propranolol Acts Centrally to Reduce Conditioned Fear in Rats Without Impairing Extinction. *Biol Psychiatry*. 65(10):887-92
- Rodriguez-Romaguera J, Ung RL, Nomura H, Otis JM, Basiri ML, Namboodiri VMK, Zhu X, Elliott Robinson J, McHenry JA, Kosyk O, Zhou TC, Kash TL, Bruchas MR, Stuber GD (2020) Prepronociceptin expressing neurons in the extended amygdala encode and promote rapid arousal responses to motivationally salient stimuli. *Cell Rep*. 10;33:108362.
- Salinas-Hernández XI, Vogel P, Betz S, Kalisch R, Sigurdsson T, Duvarci S (2018) Dopamine neurons drive fear extinction learning by signaling the omission of expected aversive outcomes. *Elife* 7.
- Santini E, Ge H, Ren K, Peña De Ortiz S, Quirk GJ (2004) Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *J Neurosci*. 24:5704-10.
- Shabel SJ, Wang C, Monk B, Aronson S, Malinow R (2019) Stress transforms lateral habenula reward responses into punishment signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 116:12488-12493.
- Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ (2011) Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*. 36:529-538.
- Song M, Jo YS, Lee YK, Choi JS (2017) Lesions of the lateral habenula facilitate active avoidance learning and threat extinction. *Behav Brain Res*. 318:12-17.
- Sotres-Bayon F, Bush DEA, LeDoux JE (2004) Emotional perseveration: An update on prefrontal-amygdala interactions in fear extinction. *Learn Mem*. 11(5):525-35.
- Sotres-Bayon F, Bush DEA, LeDoux JE (2007) Acquisition of fear extinction requires activation of NR2B-containing NMDA receptors in the lateral amygdala. *Neuropsychopharmacology*. 32(9):1929-40.
- Sotres-Bayon F, Cain CK, LeDoux JE (2006) Brain Mechanisms of Fear Extinction: Historical Perspectives on the Contribution of Prefrontal Cortex. *Biol Psychiatry*. 60:329-336.
- Sotres-Bayon F, Diaz-Mataix L, Bush DEA, LeDoux JE (2009) Dissociable roles for the ventromedial prefrontal cortex and amygdala in fear extinction: NR2B contribution. *Cereb Cortex*. 19:474-82.
- Sotres-Bayon F, Quirk GJ (2010) Prefrontal control of fear: More than just extinction. *Curr Opin Neurobiol*. 20:231-235.

- Sotres-Bayon F, Sierra-Mercado D, Pardilla-Delgado E, Quirk GJ (2012) Gating of Fear in Prelimbic Cortex by Hippocampal and Amygdala Inputs. *Neuron*. 76:804-12.
- Stamatakis AM, Jennings JH, Ung RL, Blair GA, Weinberg RJ, Neve RL, Boyce F, Mattis J, Ramakrishnan C, Deisseroth K, Stuber GD (2013) A Unique Population of Ventral Tegmental Area Neurons Inhibits the Lateral Habenula to Promote Reward. *Neuron*. 80:1039-53.
- Stamatakis AM, Stuber GD (2012) Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance. *Nat Neurosci*. 15:1105-1107.
- Stamatakis AM, Van Swieten M, Basiri ML, Blair GA, Katak P, Stuber GD (2016) Lateral hypothalamic area glutamatergic neurons and their projections to the lateral habenula regulate feeding and reward. *J Neurosci*. 36(2):302-11.
- Stephenson-Jones M, Bravo-Rivera C, Ahrens S, Furlan A, Xiao X, Fernandes-Henriques C, Li B (2020) Opposing Contributions of GABAergic and Glutamatergic Ventral Pallidal Neurons to Motivational Behaviors. *Neuron*. 105:921-933.
- Stephenson-Jones M, Yu K, Ahrens S, Tucciarone JM, Van Huijstee AN, Mejia LA, Penzo MA, Tai LH, Wilbrecht L, Li B (2016) A basal ganglia circuit for evaluating action outcomes. *Nature*. 539:289-293.
- Stopper CM, Floresco SB (2014) What's better for me? Fundamental role for lateral habenula in promoting subjective decision biases. *Nat Neurosci*. 17:33-35.
- Thornton EW, Bradbury GE (1989) Effort and stress influence the effect of lesion of the habenula complex in one-way active avoidance learning. *Physiol Behav*. 45:929-935.
- Tomaiuolo M, Gonzalez C, Medina JH, Piriz J (2014) Lateral Habenula determines long-term storage of aversive memories. *Front Behav Neurosci*. 8:170.
- Trusel M, Nuno-Perez A, Lecca S, Harada H, Lalive AL, Congiu M, Takemoto K, Takahashi T, Ferraguti F, Mameli M (2019) Punishment-Predictive Cues Guide Avoidance through Potentiation of Hypothalamus-to-Habenula Synapses. *Neuron*. 102:120-127 e124.
- Vale-Martínez A, Martí-Nicolovius M, Guillazo-Blanch G, Coll-Andreu M, Morgado-Bernal I (1997) Effects of habenular lesions upon two-way active avoidance conditioning in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 68:68-74.
- VanElzakker MB, Kathryn Dahlgren M, Caroline Davis F, Dubois S, Shin LM (2014) From Pavlov to PTSD: The extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety

disorders. *Neurobiol Learn Mem.* 113:3-18.

Varga V, Kocsis B, Sharp T (2003) Electrophysiological evidence for convergence of inputs from the medial prefrontal cortex and lateral habenula on single neurons in the dorsal raphe nucleus. *Eur J Neurosci.* 17:280-286.

Wang D, Li Y, Feng Q, Guo Q, Zhou J, Luo M (2017) Learning shapes the aversion and reward responses of lateral habenula neurons. *Elife* 6.

Wilcox KS, Christoph GR, Double BA, Leonzio RJ (1986) Kainate and electrolytic lesions of the lateral habenula: Effect on avoidance responses. *Physiol Behav.* *Physiol Behav.* 36:413-417.

Wilson JR, Mitchell JC, Van Hoesen GW (1972) Epithalamic and ventral tegmental contributions to avoidance behavior in rats. *J Comp Physiol Psychol.* 78(3):442-9.

Yang Y, Cui Y, Sang K, Dong Y, Ni Z, Ma S, Hu H (2018) Ketamine blocks bursting in the lateral habenula to rapidly relieve depression. *Nature.* 554:317-322.

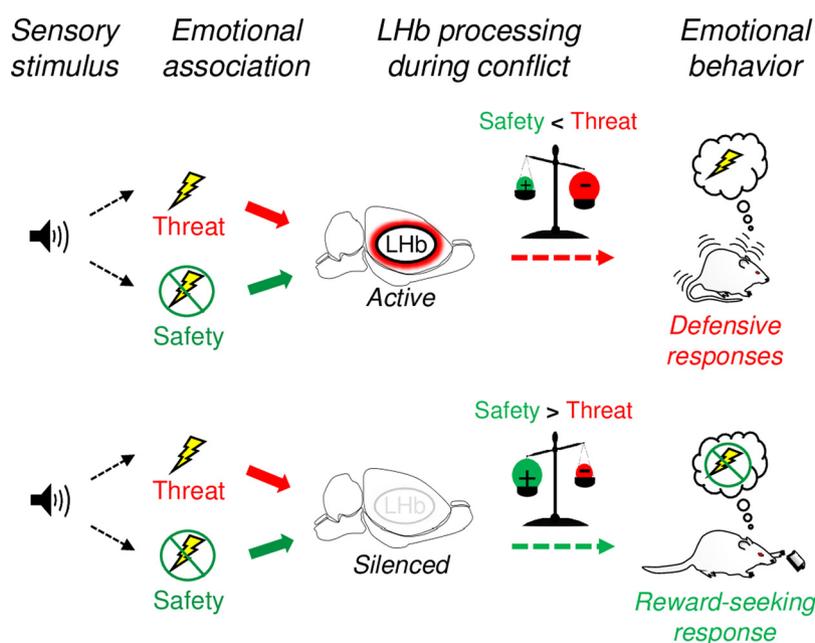
Cognition and Behavior

Lateral Habenula Mediates Defensive Responses Only When Threat and Safety Memories Are in Conflict

Geronimo Velazquez-Hernandez and  Francisco Sotres-Bayon<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0482-20.2021>

Cell Physiology Institute–Neuroscience, National Autonomous University of Mexico, Mexico City 04510, Mexico

Visual Abstract



Survival depends on the ability to adaptively react or execute actions based on previous aversive salient experiences. Although lateral habenula (LHb) activity has been broadly implicated in the regulation of aversively motivated responses, it is not clear under which conditions this brain structure is necessary to regulate defensive responses to a threat. To address this issue, we combined pharmacological inactivations with behavioral

Significance Statement

Using emotional memories with opposing valence (negative or positive) to select the appropriate behavior is most valuable for survival when individuals are challenged to retrieve them simultaneously, during conflict. Although the lateral habenula (LHb) processes information about negative and positive events and is involved in guiding emotional behaviors, its contribution during conflict has not been characterized. By combining pharmacological inactivations with behavioral paradigms in rats, including tasks involving retrieval of competing threat and safety memories, our study reveals a previously unknown role for the LHb in driving defensive responses during experience-dependent emotional conflict. Identifying brain regions required for conflict-mediated behavioral responses may be key for understanding how the brain balances information about competing salient experiences to regulate emotional behaviors.

tasks that involve aversive and appetitive events and evaluated defensive responses in rats. We found that LHB pharmacological inactivation did not affect cued threat conditioning (fear) and extinction (safety) learning and memory, anxiety-like or reward-seeking behaviors. Surprisingly, we found that LHB inactivation abolished reactive defensive responses (tone-elicited freezing) only when threat (conditioning) and safety memories (extinction and latent inhibition) compete during retrieval. Consistently, we found that LHB inactivation impaired active defensive responses [platform-mediated avoidance (PMA)], thereby biasing choice behavior (between avoiding a threat or approaching food) toward reward-seeking responses. Together, our findings suggest that LHB activity mediates defensive responses only when guided by competing threat and safety memories, consequently revealing a previously uncharacterized role for LHB in experience-dependent emotional conflict.

Key words: conflict; decision-making; emotion; fear; habenula; motivation

Introduction

In nature, survival in a dynamic environment requires animals to adaptively react or execute actions based on previous salient experiences (Elliot, 2008; Rangel et al., 2008; Namburi et al., 2016; Bravo-Rivera and Sotres-Bayon, 2020). In the laboratory, the regulation of reactive and active behaviors guided by stimuli that signal threat or safety and reward have been studied by using animal model combinations of aversive classical (Pavlovian) and appetitive instrumental conditioning (LeDoux, 2000; Cardinal et al., 2002). Auditory threat (fear) conditioning, in combination with lever pressing to obtain food, has been used to reliably evaluate defensive responses elicited after learning and memory of threat associations (tones paired with shocks) and its extinction (tones paired with omission of expected shocks; Quirk et al., 2000; Sotres-Bayon et al., 2012). After extinction, the conditioned memory of threat and extinction memory of safety, coexist in the brain and compete for control of behavior (Quirk, 2007; Sotres-Bayon and Quirk, 2010; Lacagnina et al., 2019). Other experimental conditions that can be used to study the conflict between threat and safety memories is conditioned latent inhibition, which involves threat association of a tone that was previously associated with safety (Lingawi et al., 2017), as well as more recently developed

tasks that involve the use of conflict choice behavior (Bravo-Rivera and Sotres-Bayon, 2020), such as platform-mediated avoidance (PMA; Diehl et al., 2019). The use of these behavioral paradigms can help us characterize how the brain retrieves emotional memories to adaptively choose a defensive behavioral strategy.

The lateral habenula (LHB) has recently attracted much attention for its involvement in the regulation of a variety of behavioral responses triggered by aversive events (Hikosaka, 2010; Lammel et al., 2014; Proulx et al., 2014; Baker et al., 2016), including threat avoidance (Stamatakis and Stuber, 2012; Amo et al., 2014; Vincenz et al., 2017; Trusel et al., 2019; Stephenson-Jones et al., 2020), freezing (Martínez-Canabal et al., 2019), and choice behavior bias (Stopper and Floresco, 2014; Baker et al., 2017). The broad involvement of LHB in processing of aversive events is partly explained by its widely documented increase of activity in response to a variety of adverse stimuli, including those that were initially neutral but that have been conditioned to predict threatening events (Matsumoto and Hikosaka, 2009; Trusel et al., 2019). However, it is not clear whether LHB is necessary to control threat-related behavioral responses ubiquitously. LHB lesions or pharmacological inactivations facilitated (Song et al., 2017), impaired (Thornton and Bradbury, 1989), or had no effect (Vale-Martínez et al., 1997; Shumake et al., 2010; Ilango et al., 2013) on threat avoidance. In addition, LHB contribution to another commonly evaluated defensive response, such as freezing, have been scarcely explored (Heldt and Ressler, 2006). Importantly, although LHB is predominantly involved with learning from negative events (Matsumoto and Hikosaka, 2009; Tian and Uchida, 2015), it has also been shown to signal positive value information (Stamatakis and Stuber, 2012). LHB neurons decrease their activity to positive stimuli, including those stimuli that have been conditioned to predict reward (Matsumoto and Hikosaka, 2009) and events that may signal safety through omission of threat (Li et al., 2019). Thus, given that LHB appears to simultaneously processes information about negative and positive events to guide motivated behaviors, it is possible that this brain region is critically involved under conditions that challenge individuals to convey information about opposing acquired values to adaptably control defensive responses.

To fully characterize LHB requirement in the control of defensive responses, we combined pharmacological inactivations with behavioral paradigms that involve threat stimuli, appetitive events and their competition. Surprisingly,

Received November 10, 2020; accepted January 23, 2021; First published March 12, 2021.

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: G.V.-H. and F.S.-B. designed research; G.V.-H. performed research; G.V.-H. and F.S.-B. analyzed data; G.V.-H. and F.S.-B. wrote the paper.

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Grant PN2463, Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Grants IN205417 and IN214520, and the International Brain Research Organization Return Home Fellowship (to F.S.-B.). G.V.-H. is a doctoral student at Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas at UNAM and was supported by the CONACyT Fellowship 658352.

Acknowledgements: We thank Ana Peñas-Rincón for technical assistance in avoidance experiments and Gregory J. Quirk, Christian Bravo-Rivera, and Leticia Ramirez-Lugo for helpful discussions and comments on this manuscript.

Correspondence should be addressed to Francisco Sotres-Bayon at sotres@ifc.unam.mx.

<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0482-20.2021>

Copyright © 2021 Velazquez-Hernandez and Sotres-Bayon

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

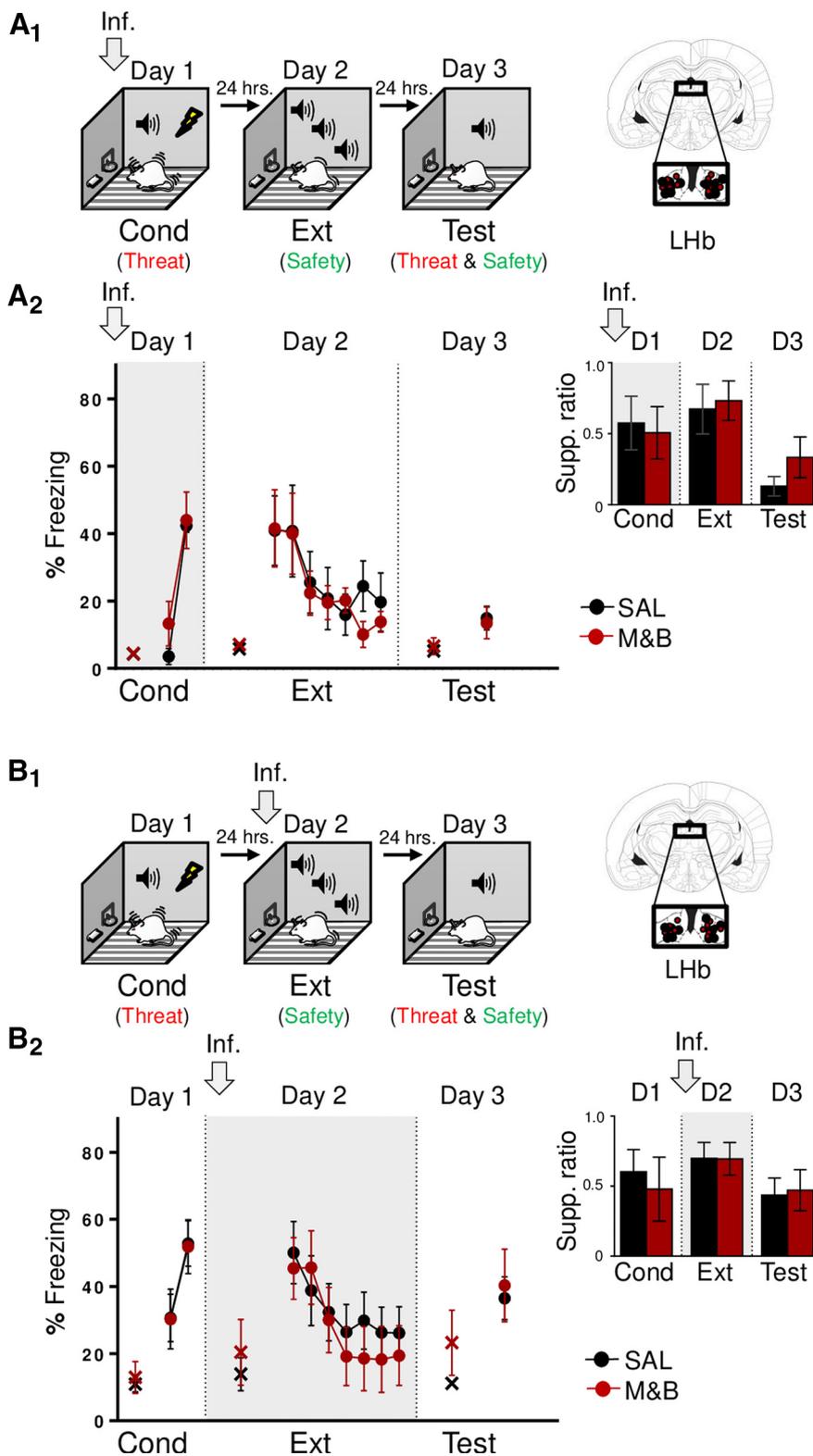


Figure 1. LHb inactivation before threat and extinction training does not affect learning and memory. **A₁, B₁**, left, Schematic representation of rats training. Rats were infused with SAL or M&B into LHb (gray arrow) before being trained to associate a tone with foot-shocks (day 1; Cond, conditioning). This training represents threat learning (red). One day later, rats were trained to associate the same tone with the absence of foot-shocks (day 2; Ext, extinction), which represents safety learning (green). Finally, the next day, rats were presented with tones only (day 3, test), which involves the retrieval competition of coexisting threat (red) and safety (green) memories to control defensive responses. Right, Coronal drawings of rat brain atlas showing placements of the injector tips in LHb. **A₂**, LHb inactivation before threat conditioning (day 1; gray arrow and shaded area in graph), did not affect threat learning

continued

(day 1) or its memory formation (day 2), as indicated similar levels of tone-elicited freezing and lever-press suppression ratio [inset; late conditioning (last two-tone trial block), early extinction (first two-tone trial block), and test] between groups (SAL, $n=5$; M&B, $n=7$). **B₂**, Infusion of M&B into LHb before extinction training (day 2; gray arrow and shaded area in graph), did not affect, expression of threat memory (day 2), safety learning (day 2) or its memory formation (day 3), as indicated by similar levels of percent freezing and lever-press suppression ratio [inset, late conditioning (last two-tone trial block), early extinction (first two-tone trial block), and test] between groups (SAL, $n=11$; M&B, $n=9$). Data are shown as \pm SEM in blocks of two trials. LHb, lateral habenula. Inf, infusion. Supp. ratio, suppression ratio; x, baseline (pretone) freezing levels.

we found that LHb activity is critical to promote reactive (freezing to a tone) and active (avoidance to a tone) defensive response only when threat (conditioning) and safety (extinction and latent inhibition) memories are in conflict.

Materials and Methods

Subjects

A total of 144 adult male Wistar rats (Cell Physiology Institute breeding colony) and weighing 260–280 g were housed in polyethylene cages and maintained on a standard 12/12 h light/dark cycle. Rats were housed individually, handled daily to diminish stress responses and received water *ad libitum* during all experiments. Rats

were kept on a restricted diet (12 g/d) of standard laboratory rat chow to facilitate pressing a lever for sucrose pellets (Bio-Serv). All manipulations and behavioral procedures were performed during the light phase between 7 A.M. and 7 P.M. All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the National Autonomous University of Mexico (UNAM) in compliance with the National Ministry of Health guidelines for the care of laboratory animals.

Surgery

Rats were anesthetized with isoflurane inhalant gas and implanted with 23-gauge stainless steel guide cannulas (AM Systems) targeting the lateral region of the habenula

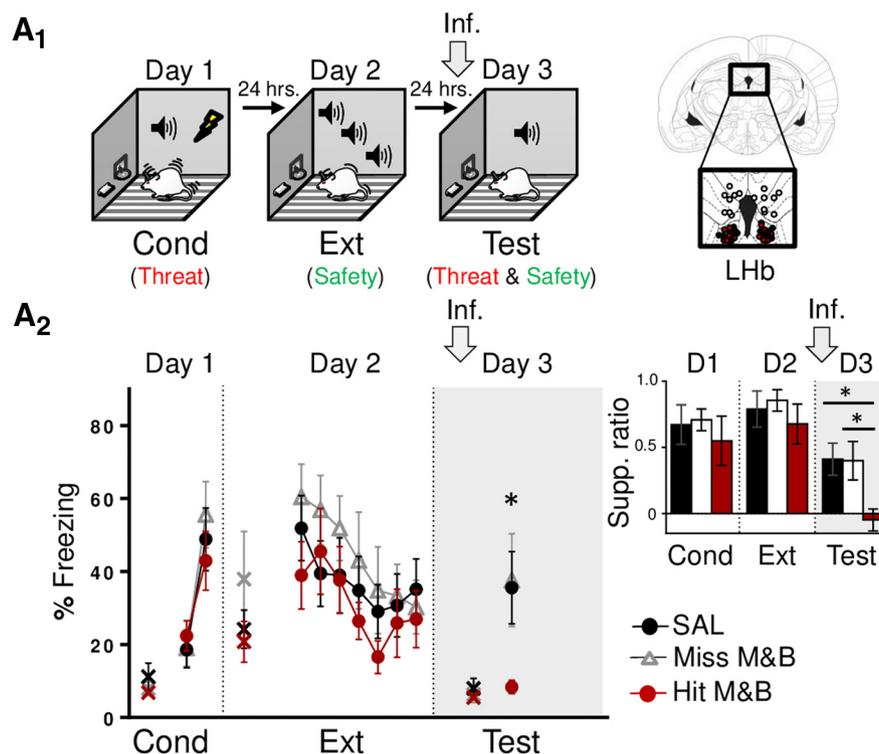


Figure 2. LHb inactivation before memory test, after extinction, abolishes defensive responses. **A₁**, left, Schematic representation of rats training. Rats were trained to associate tones with foot-shocks (day 1; Cond, conditioning), which represents threat learning (red). One day later, rats were trained to associate the same tone with the absence of foot-shocks (day 2; Ext, extinction), which represents safety learning (green). Finally, the next day, rats were infused with SAL or M&B into LHb (gray arrow) before being presented with tones only (day 3, test), which involves the retrieval competition of coexisting threat (red) and safety (green) memories to control defensive responses. Right, Coronal drawings of rat brain atlas showing placements of the injector tips in LHb. **A₂**, LHb inactivation before retrieval test (day 3), after extinction (gray arrow and shaded area in graph), decreased defensive responses, as indicated by lower levels of tone-elicited percent freezing and lever-press suppression ratio [inset; late conditioning (last two-tone trial block), early extinction (first two-tone trial block), and test] in the experimental group as compared with the control groups (SAL, $n=7$; miss M&B, $n=8$; hit M&B, $n=9$). Data are shown as \pm SEM in blocks of two trials. LHb, lateral habenula. Inf, infusion. Supp. ratio, suppression ratio; x, baseline (pretone) freezing levels; $*p < 0.05$.

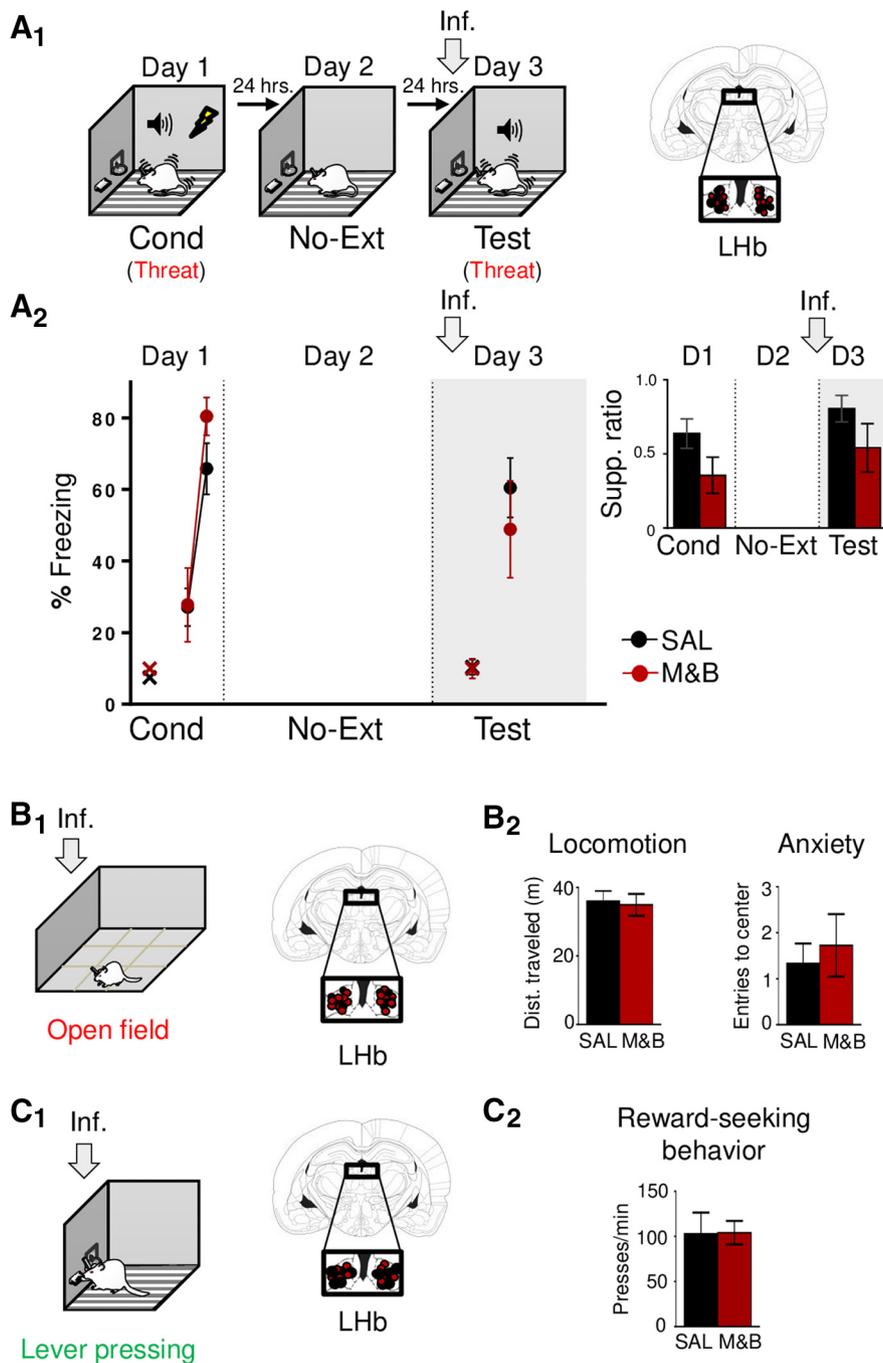


Figure 3. Lhb inactivation effect is extinction-dependent and not attributable to impairments in locomotion or other emotional behaviors. **A₁**, left, Schematic representation of rats training. Rats were trained to associate a tone with foot-shocks (day 1; Cond, conditioning), which represents threat learning (red). One day later, rats were put back in the conditioning chamber (day 2; No Ext, no tone extinction). The next day, rats were infused with SAL or M&B into Lhb (gray arrow) before being presented with tones only (day 3, test), which represents the retrieval of the threat-related memory (red). Right, Coronal drawings of rat brain atlas showing placements of the injector tips in Lhb. **A₂**, Lhb inactivation before retrieval test (day 3) without extinction (gray arrow and shaded area in graph), did not affect defensive responses to the tone, as indicated by similar levels of tone-elicited percent freezing and lever-press suppression ratio (inset, late conditioning; last two-tone trial block and test) between control and experimental groups (SAL, $n = 8$; M&B, $n = 6$). Data are shown as \pm SEM in blocks of two trials. Supp. ratio, suppression ratio; x, baseline (pretone) freezing levels. **B₁**, left, Schematic representation of open field task. Right, Coronal drawings of rat brain atlas showing the placements of the injector tips in Lhb. **B₂**, Lhb inactivation did not affect locomotion or anxiety-related behavior, as indicated by similar distance traveled and number of entries to the center of the field (SAL, $n = 12$; M&B, $n = 11$). **C₁**, left, Schematic representation of lever pressing. Right, Coronal drawings of rat brain atlas showing the placements of the injector tips in Lhb. **C₂**, Lhb inactivation did not affect reward-seeking behavior, as indicated by similar presses per minute to obtain food (SAL, $n = 5$; M&B, $n = 7$). Lhb, lateral habenula. Inf, infusion.

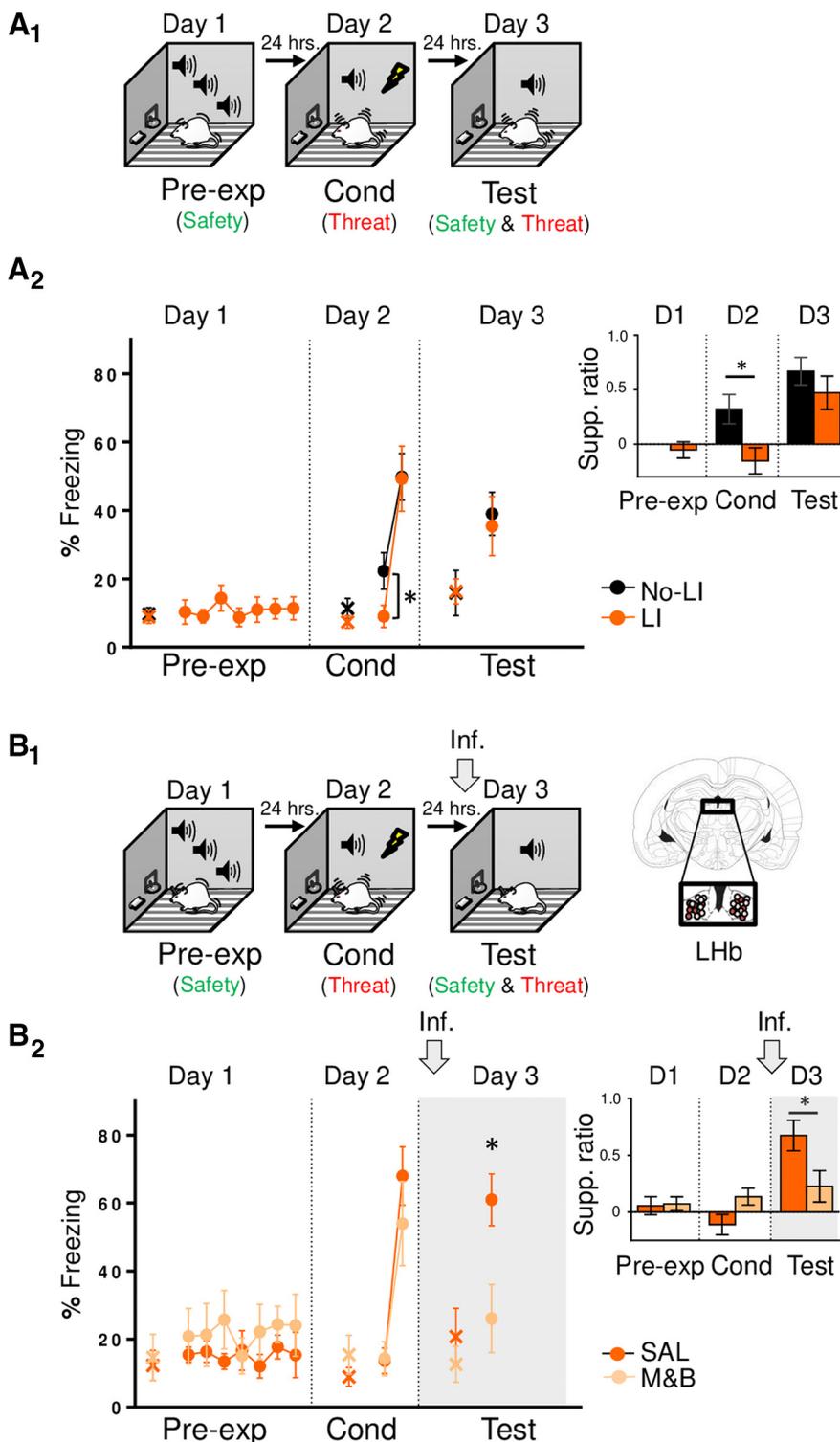


Figure 4. LHb inactivation before retrieval test, after conditioned latent inhibition, abolishes defensive responses. **A₁**, Schematic representation of rats training. Rats were either presented with tones (latent inhibition group: LI), which represents safety learning (green), or simply placed in the conditioning chamber (no-latent inhibition group: No-LI; day 1; Pre-exp, preexposure). One day later, both groups were placed in the same behavioral chamber and trained to associate a tone with foot-shocks (day 2; Cond, conditioning), which represents threat learning (red). Finally, the next day, were presented with tones only (day 3, test), which involves the retrieval competition of coexisting safety (green) and threat (red) memories to control defensive responses. **A₂**, Tone preexposure weakened subsequent threat learning, as indicated by lower tone-elicited percent freezing and lever-press suppression ratio (inset; late preexposure, early conditioning, and test) levels of the LI group, as compared with No-LI group at the beginning of

continued

conditioning (No-LI, $n = 11$; LI, $n = 12$). **B₁**, left, Schematic representation of rats training. Rats were pre exposed to tones alone (day 1; Pre-exp, preexposure), which represents safety learning (green). One day later, rats were trained to associate the tone with foot-shocks (day 2; Cond, conditioning), which represents threat learning (red). Finally, the next day, rats were infused with SAL or M&B into LHb (gray arrow) before being presented with tones only (day 3, test), which involves the retrieval competition of coexisting safety (green) and threat (red) memories to control defensive responses. Right, Coronal drawings of rat brain atlas showing placements of the injector tips in LHb. **B₂**, LHb inactivation before retrieval test (day 3), after latent inhibition and conditioning (gray arrow and shaded area in graph), decreased defensive responses as indicated by lower levels of tone-elicited percent freezing and lever-press suppression ratio [inset; late conditioning (last two-tone trial block), early extinction (first block of trials), and test] in the experimental group as compared with the control group (SAL, $n = 8$; M&B, $n = 5$). Data are shown as \pm SEM in blocks of two trials. LHb, lateral habenula. Inf, infusion. Supp. ratio, suppression ratio; x, baseline (pretone) freezing levels; * $p < 0.05$.

(-3.6 mm, AP, ± 0.8 mm, -4.2 mm DV with respect to bregma from skull). Cannulas were fixed with dental acrylic cement and anchored with two surgical screws placed on the skull. Stainless steel obturators were inserted into the guide cannulas to prevent clogging until infusions were made. The tips of the cannulas were aimed 0.8 mm above the target structure. After surgery, animals received food and water *ad libitum* for 7 d to allow full recovery before experiments.

Behavior

Rats were trained to press a lever for sucrose pellets (Bio-Serv) on a variable interval (VI) reinforcement schedule [VI-60 for conditioning tasks as in Sierra-Mercado et al. (2011) and VI-30 for the avoidance task as in Bravo-Rivera et al. (2014)]. All rats received six lever-press training sessions until they reached a minimum rate of 12 presses per minute in their final session. Pressing to obtain food maintains a constant level of activity against which freezing, and avoidance can be reliably measured.

Threat conditioning and extinction

Threat conditioning and extinction tasks were performed as previously described (Martínez-Canabal et al., 2019). Briefly, auditory threat conditioning and extinction was performed in standard operant chambers (Coulbourn Instruments) located inside sound-attenuating boxes (Med Associates) in an isolated testing room. The floor of the operant chambers consisted of stainless-steel bars that could deliver electric foot-shocks. Between experiments shock grids, floor trays and walls were cleaned with soap and water. On day 1, rats were subjected to threat conditioning consisting of five tone presentations (30 s, 4 kHz, 75 dB) that co-terminated each one with a foot-shock (0.5 s, 0.6 mA). On day 2, after conditioning, rats received extinction training consisting of fifteen presentations of unreinforced tones. On day 3, rats were tested for memory retrieval with two tone-alone presentations. In all sessions, the interval between tones was variable with an averaged 2 min.

Conditioned latent inhibition

On day 1, rats received latent inhibition training consisting of fifteen tone-alone presentations (30 s, 4 kHz, 75 dB). On day 2, rats were subjected to threat conditioning, consisting of five tones (30 s, 4 Hz, 75 dB) that co-terminated with a foot-shock (0.5 s, 0.6 mA). On day 3,

rats were tested for memory retrieval with two tone-alone presentations. In all sessions, the interval between tones was variable with an average of 2 min.

PMA task

PMA task was performed as previously described (Bravo-Rivera et al., 2014) using standard operant chambers (Coulbourn Instruments) located inside sound-attenuating boxes (Med Associates) in an isolated testing room. The floor of the operant chambers consisted of stainless-steel bars that could deliver electric foot-shocks. Between experiments shock grids, floor trays and walls were cleaned with soap and water. Rats were conditioned to a tone (30 s, 4 kHz, 75 dB) co-terminating with a shock delivered through a grid floor (2 s, 0.4 mA). Rats received nine tone-shock pairings each day for 10 d, with a VI between tones averaging 3 min. A safety square platform (14.0 cm per side) was located in the opposite corner of the lever to allow rats to avoid the shocks. The availability of food on the side opposite of the platform motivated rats to leave the platform during the inter-trial interval, facilitating trial-by-trial assessment of avoidance. On day 11, rats received two tones to test for memory retrieval.

Open field task

Rat locomotor activity in the open field (90 \times 90 cm) was assessed by calculating distance traveled in the periphery and center (30 \times 30 cm within) of the arena during 10 min. The overall distance traveled and number of entries to the center of the arena were used to assess locomotion and anxiety-like behavior, respectively.

Lever pressing test

Rats were trained to press a lever to receive food pellets on a VI-60 schedule (as described above). Spontaneous presses per minute were calculated to assess reward-seeking behavior during 5 min. We analyzed presses per minute before conditioning (during pretone baseline) taken from rats in the first experiment.

Drug infusion

We used GABA-A and GABA-B receptors agonists, muscimol and baclofen (M&B; Sigma-Aldrich) respectively, to enhance neuronal inhibition, thereby temporarily and reversibly inactivating the target structure. The inactivating drug cocktail was prepared on the day of the infusion using a filtered, physiological saline solution (SAL) as

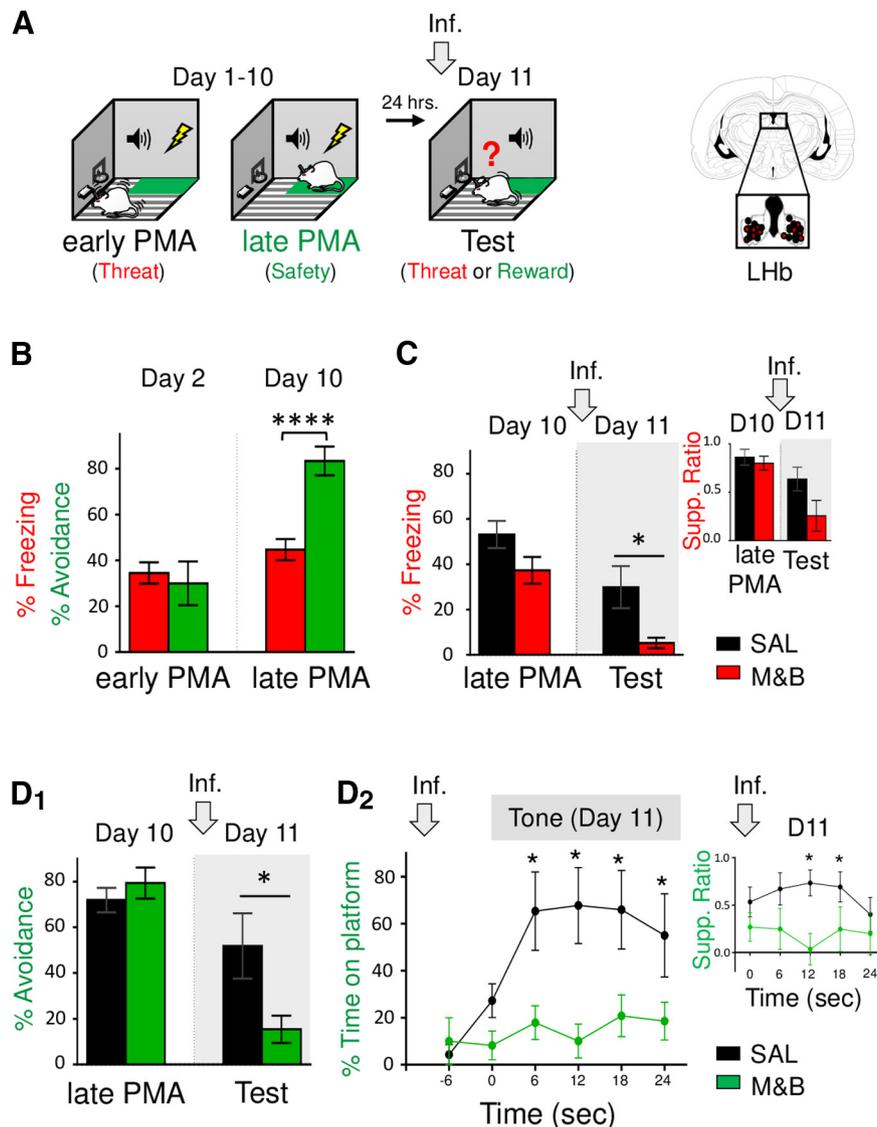


Figure 5. Lhb inactivation before PMA retrieval test biases choice-mediated defensive behavior toward reward-seeking. **A**, left, Schematic representation of rats training. Rats were trained to associate tone with foot-shocks as well as associating the tone with moving to a safety platform learn to avoid the shock (day 1–10; PMA). Early PMA (day 2) represents classical conditioned-mediated threat learning (red), whereas late PMA (day 10) represents instrumental avoidance-mediated safety learning (green). One day later, rats were infused with SAL or M&B into Lhb (gray arrow) before being presented with tones only (day 11, test), which involves the retrieval competition of coexisting threat (red) and safety (green) memories to control choice behavior. Right, Coronal drawings of rat brain atlas showing placements of the injector tips in Lhb. **B**, During early PMA training (day 2), freezing and avoidance levels are similar. In contrast, during late PMA training (day 10), avoidance levels are higher than freezing levels. Thus, avoidance levels dramatically increased with PMA training while freezing levels remain similar ($n = 15$). **C**, Lhb inactivation before PMA test (gray arrow and shaded area in graph), impaired retrieval of PMA memory, as indicated by lower tone-elicited percent freezing responses (but not suppression ratio) of the experimental group as compared with control group (SAL, $n = 7$; M&B, $n = 8$). **D**, Lhb inactivation before PMA test (gray arrow) biased choice-mediated avoidance toward reward-seeking behavior as indicated by lower tone-elicited percent avoidance (**D**₁) and time spent in platform (**D**₂), as well as lower suppression ratio (inset) in the experimental group as compared with the control group (SAL, $n = 7$; M&B, $n = 8$). Data are shown as \pm SEM in blocks of two trials in **B**, **C**, **D**₁ and in 6-s bins in **D**₂. Lhb, lateral habenula. Inf, infusion. Supp. ratio, suppression ratio; **** $p < 0.00001$, * $p < 0.05$.

vehicle and infused 10 min before behavioral testing. M&B (50 ng of each drug/0.2 μ l per side) or SAL was infused at a rate of 0.2 μ l delivered over 45 s into the target structure. Cannulas were connected via polyethylene tubing to 10- μ l syringes (Hamilton) driven by a programmable microinfusion pump (KD Scientific). After infusions, injectors were left in place for 2 min to allow the drug to diffuse. Dosages

and volumes of GABAergic agonists were based on a previous inactivation study targeting the same brain structure which limited spread to Lhb without affecting neighboring areas (Stopper and Floresco, 2014), and a pilot experiment in our laboratory (combining habenula infusions and c-Fos expression) showing that local inactivation of the habenula silenced Lhb recruited activity.

Histology

After all behavioral experiments, rats were deeply anesthetized with pentobarbital sodium (150 mg/kg, i.p.) to transcardially perfused with 0.9% SAL. Brains were then harvested and stored in a 10% formalin solution (Sigma-Aldrich) for at least 2 d. Then we switched the brains to a 30% sucrose solution for cryoprotection. Brains were cut in 45- μ m-thick coronal sections using a cryostat (Leica CM1520 Cryostat, RRID:SCR_017543) and stained for Nissl bodies with cresyl violet and examined under a bright field microscope (Nikon, H550S) to verify cannula tip placements. Only animals with localized injector tips within LHB were included in statistical analysis; except for one experiment (LHB inactivation after extinction), in which analysis of data included animals where injector tips were localized within or outside the LHB (hit M&B and miss M&B groups, respectively).

Data collection and analysis

All behavioral responses were recorded with digital video cameras (Logitech) and automatically analyzed with a commercial software (ANY-maze, RRID:SCR_014289). Two measures of defensive responses were assessed throughout all experiments: (1) % of time spent freezing and (2) suppression ratio. Freezing was defined as the absence of all movement, except respiration. The amount of time freezing to the tone was expressed as the percentage of the tone duration. We also measured time spent freezing before tone presentations (5 min), during context exposure (pretone freezing). There were little contextual-elicited defensive responses across all experiments (SAL and M&B groups), as evidenced by low levels of pretone freezing (all group averages < 12.03%). In all experiments pretone freezing percentages were not significantly different between experimental and control groups (all p values > 0.05). Matching of animal groups (experimental and controls) for similar levels of freezing responses before local drug infusions were done in all experiments ($p=0.95$). A suppression ratio comparing pretone press rates with tone press rates was calculated as follows: (pretone – tone)/(pretone + tone). A value of 0 represents no suppression (low defensive response levels), whereas a value of +1 represents complete suppression of lever pressing (high defensive response levels). Avoidance responses were assessed by calculating the percentage of rats that avoided the footshock by moving on to the platform during the last two seconds of tone presentations and time spent on platform before and after tone presentation. Groups were compared by using, when appropriate, unpaired Student's two-tailed t tests, one-way or repeated-measures ANOVA followed by *post hoc* Fisher's least significant difference test (STATISTICA; StatSoft; RRID:SCR_014213 and Prism; GraphPad Prism RRID:SCR_002798). Alpha was set at $p=0.05$.

Results

Although LHB activity has been broadly implicated in the regulation of aversively motivated behaviors (Thornton and Bradbury, 1989; Matsumoto and Hikosaka, 2009;

Stamatakis and Stuber, 2012; Amo et al., 2014; Lecca et al., 2017; Song et al., 2017; Vincenz et al., 2017; Martínez-Canabal et al., 2019; Trusel et al., 2019), it is not always necessary for regulating defensive responses to a threat (Vale-Martínez et al., 1997; Heldt and Ressler, 2006; Shumake et al., 2010; Ilango et al., 2013; Song et al., 2017). To systematically evaluate the necessity of LHB under different aversive conditions, we combined pharmacological inactivations with behavioral tasks that involve aversive and appetitive motivations and evaluated defensive behavioral responses in rats.

Lhb inactivation does not affect threat or extinction learning and memory

To evaluate the requirement of LHB on threat learning and memory, we pharmacologically inactivated the LHB before auditory threat conditioning on day 1 (Fig. 1A1). We found that inactivation of LHB before threat conditioning did not affect threat acquisition or its retrieval (Fig. 1A2), as indicated by similar levels of defensive responses across groups (day 1, freezing: $F_{(1,10)} = 0.71$, $p=0.41$; lever-press suppression ratio: SAL: $t_{(10)} = -0.25$, $p=0.80$) and the first two-tone trial block of extinction training (day 2, freezing: $t_{(10)} = 0.03$, $p=0.96$; lever-press suppression ratio: $t_{(10)} = 0.26$, $p=0.79$), respectively. Also, LHB inactivation before threat conditioning did not affect extinction acquisition 1 d later or its retrieval 2 d later, as indicated by similar levels of defensive responses across groups in extinction training (day 2, freezing: $F_{(6,60)} = 0.61$, $p=0.71$; lever-press suppression ratio: $F_{(6,60)} = 0.52$, $p=0.78$) and in the memory test (day 3, freezing: $t_{(10)} = -0.22$, $p=0.82$; lever-press suppression ratio: $t_{(10)} = 1.12$, $p=0.28$). Thus, consistent with previous reports (Heldt and Ressler, 2006; Song et al., 2017), our findings suggest that LHB is not necessary for threat learning and memory.

We next investigated the necessity of LHB on threat memory retrieval as well as on extinction learning and memory by pharmacologically inactivating the LHB before auditory threat extinction training (Fig. 1B1). Rats were infused with either SAL or M&B into the LHB on day 2, before threat extinction training. One day later (day 3), rats were tested for retrieval of emotional memory to the tone. We found that inactivation of LHB before threat extinction did not affect retrieval of threat memory or extinction acquisition (Fig. 1B2), as indicated by similar levels of defensive responses across groups in the first block of two-tone trials of extinction training (day 2, freezing: $t_{(18)} = -0.35$, $p=0.72$; lever-press suppression ratio: $t_{(18)} = -0.02$, $p=0.97$) and overall during extinction training (day 2, freezing: $F_{(6,108)} = 0.92$, $p=0.47$; lever-press suppression ratio: $F_{(6,108)} = 1.90$, $p=0.08$), respectively. Additionally, consistent with a previous report (Song et al., 2017), we found that LHB inactivation before extinction training, did not affect retrieval of extinction-mediated safety memory 1 d later, as indicated by similar levels of defensive responses across groups during memory test (day 3, freezing: $t_{(18)} = 0.31$, $p=0.75$; lever-press suppression ratio: $t_{(18)} = 0.18$, $p=0.85$). Thus, these results suggest that LHB is not necessary for threat memory retrieval as well as not necessary for extinction learning and

memory. Together our findings indicate that LHB is not necessary for threat and extinction learning and memory.

LHB inactivation impairs defensive responses during extinction-dependent retrieval

To evaluate the necessity of LHB in retrieval events after extinction learning, involving the competition of coexisting conditioned-mediated threat memory and extinction-mediated safety memory, we pharmacologically inactivated the LHB before retrieval memory test on day 3 (Fig. 2A1). Surprisingly, we found that LHB inactivation before memory test, after extinction, abolished defensive responses (freezing and suppressed pressing) to pre-conditioning levels of the experimental group as compared with control group during memory test (day 3, freezing: SAL: 35.59%; M&B: 8.39%; $t_{(14)} = -3.06$, $p = 0.008$; lever-press suppression ratio: SAL: 0.41; M&B: -0.04 ; $t_{(14)} = -3.22$, $p = 0.006$). Based on a previous LHB inactivation study (Stopper and Floresco, 2014) and to further examine the neuroanatomical specificity of the inactivation effect, after histology, data were separated into three groups: one SAL-infused group and two M&B-infused groups. One group represents, a neuroanatomical control, in which placements missed (miss M&B) the targeted brain region (placements included dorsal hippocampus and third ventricle) and another group represents rats where placements directly hit (hit M&B) only in the LHB (day 3, freezing: SAL: 35.59%, miss M&B: 37.64%, hit M&B: 8.39%; $F_{(2,21)} = 3.54$, $p = 0.04$; *post hoc* comparisons: SAL and hit M&B: $p = 0.04$, miss M&B and hit M&B: $p = 0.02$, and SAL and miss M&B: $p = 0.87$; lever-press suppression ratio: SAL: 0.41, miss M&B: 0.39, hit M&B: -0.04 ; $F_{(2,21)} = 5.28$, $p = 0.01$; *post hoc* comparisons: SAL and hit M&B: $p = 0.01$, miss M&B and hit M&B: $p = 0.01$, and SAL and miss M&B: $p = 0.94$; Fig. 2A2). Results after comparison between experimental (hit M&B) and control groups (SAL and miss M&B) reveal that the effects of inactivation on memory retrieval after extinction were circumscribed to the LHB, but not nearby regions. That LHB inactivation before the retrieval test decreased defensive responses could be interpreted as an impairment in the expression of defensive responses. However, this is unlikely given that LHB inactivation did not impair defensive response expression when performed before conditioning or before extinction training (see day 1 in Fig. 1A2 and day 2 in Fig. 1B2). Another possible interpretation to this result is that LHB inactivation before testing impaired threat memory retrieval. However, this is also unlikely given that LHB inactivation did not impair threat memory retrieval when performed before extinction training (see first two-tone trial block in day 2 in Fig. 1B2). Yet another possibility is that LHB inactivation before the retrieval test facilitated extinction memory thereby biasing the expression of the extinction memory over threat memory. This last interpretation suggests that LHB may be necessary to regulate competing threat and safety memories by promoting defensive responses. But before testing this idea further, we decided to test whether the observed LHB inactivation effect was dependent or not on extinction triggered by the tone (rather than the mere passing of time or context

exposure) and also evaluate whether LHB inactivation causes unspecific effects on basic locomotor activity or independent motivated behaviors.

To evaluate the necessity of LHB to memory retrieval without tone-associated extinction, we inactivated LHB before memory tests in rats that were not exposed to the tone during extinction (No-Ext; Fig. 3A1). Similar to the experiment above, on day 1, rats were threat conditioned to a tone. The next day (day 2), rats were put back in the conditioned chamber without tone exposure. Finally, on day 3, rats were infused with either SAL or M&B into the LHB and tested for memory retrieval to the tone. We found that LHB inactivation before memory test without tone extinction, did not affect retrieval of conditioned tone threat memory (Fig. 3A2), as indicated by similar levels of defensive responses across groups during retrieval test (day 3, freezing: $t_{(12)} = -0.76$, $p = 0.45$; lever-press suppression ratio: $t_{(12)} = -1.51$, $p = 0.15$). This result is consistent with the interpretation that LHB inactivation effect during retrieval test are not because of impairment on the expression of defensive responses or threat memory retrieval to the conditioned tone and that such effect is extinction-dependent to the tone and not the mere passage of time.

Next, in a different group of animals, we tested the effect of LHB inactivation on basic locomotion activity, an innate aversively motivated behavior (exploration in an open field) and an appetitively motivated behavior. We tested this by infusing SAL or M&B into the LHB before an open field task and before a lever pressing test. We found that LHB inactivation does not affect locomotion, anxiety-related (Fig. 3B1,B2) or reward-seeking behaviors (Fig. 3C1,C2), as indicated by similar levels of total distance traveled ($t_{(21)} = -0.25$, $p = 0.80$) and entries to the center of the open field ($t_{(21)} = 0.49$, $p = 0.62$), as well as similar levels of presses per minute to obtain food ($t_{(10)} = 0.04$, $p = 0.96$), respectively. These control experiments suggest that LHB inactivation (on its own) does not affect general movement, hunger, motivation to explore related to anxiety-like behavior or reward-seeking behavior.

LHB inactivation impairs defensive responses during latent inhibition retrieval

Together, our above results are consistent with the idea that rather than being necessary for simple task performance (freezing or not to the tone), LHB-mediated activity is crucial for flexible and adaptive behaviors during more complex situations in mammals (Baker et al., 2017). Threat and extinction learning and memory as well as expression of defensive responses by themselves may represent relatively simple situations as compared with flexibly selecting the adaptive emotional memory (threat or safety) to control (promote or suppress) the expression of defensive behaviors. Such a situation occurs when coexisting threat and safety memories compete for control of behavior after extinction training. To further test the idea that LHB is necessary in conditions where coexisting threat and safety memories compete for control of behavior, we switched the order of opposing emotional learning experiences (safety learning followed by threat learning

rather than threat learning followed by safety learning) by using latent inhibition (Fig. 4A1). To do this, on day 1, rats were either trained to acquire a latent inhibition-mediated safety memory by presenting tones without foot-shocks (latent inhibition group: LI) or simply placed in the conditioning chamber (no tones or foot-shocks; no latent inhibition group: No-LI). On day 2, both group of rats were threat conditioned to the tone. One day later (day 3), rats were tested for memory retrieval to the tone. As expected, we found that preexposure to a tone, weakened subsequent threat conditioning to tones (Fig. 4A2), as indicated by lower defensive response levels of the LI group with respect to No-LI group at the beginning of conditioning (first two-tone trial block; freezing: No-LI: 22.30%; LI: 9.03%; $t_{(21)} = -2.16, p = 0.04$; lever-press suppression ratio: No-LI: 0.32; LI: -0.15 ; $t_{(21)} = -2.64, p = 0.01$). On day 3, both groups showed similar defensive response levels (freezing: $t_{(21)} = -0.33, p = 0.74$; lever-press suppression ratio: $t_{(21)} = -0.98, p = 0.33$). This result suggests that cued-mediated latent inhibition leads to the formation of a safety memory that retards conditioning learning to the tone. Next, to evaluate the necessity of LHb during the competition of coexisting latent inhibition-mediated safety memory and conditioned-mediated threat memory, we pharmacologically inactivated the LHb before a postconditioning memory test (Fig. 4B1). On day 1, rats were preexposed to the tone. The next day (day 2), rats were conditioned to the tone by pairing tones with foot-shocks. Finally, on day 3, rats were infused with either SAL or M&B into the LHb and tested for memory retrieval to the tone. Similar to infusion during retrieval after extinction, we found that LHb inactivation before memory test, after conditioning, decreased defensive response levels of the experimental group as compared with control group during memory test (day 3, freezing: SAL: 61.00%, M&B: 26.09%; $t_{(11)} = -2.80, p = 0.01$; lever-press suppression ratio: SAL: 0.65, M&B: 0.22; $t_{(11)} = -2.25, p = 0.04$; Fig. 4B2). Since we ruled out above that LHb inactivation impairs the expression of defensive responses and threat memory retrieval, this finding supports the idea that LHb inactivation before the retrieval test biased toward facilitated the expression of the latent inhibition-mediated safety memory over the conditioned-mediated threat memory. This last interpretation suggests that, independently of when those opposing emotional memories are formed (safety before threat memory or threat before safety memory), LHb is necessary to regulate competing and coexisting threat and safety memories by promoting defensive responses to ultimately exert control over adaptive behaviors.

LHb inactivation switches choice behavior bias from avoidance to reward-seeking

Besides influencing adaptive defensive responses triggered by threats like freezing (this study and Martínez-Canabal et al., 2019) and avoidance (Thornton and Bradbury, 1989; Tomaiuolo et al., 2014; Trusel et al., 2019), LHb activity has been recently implicated in biasing choice behavior (Stopper and Floresco, 2014; Baker et al., 2017; Mathis et al., 2017). Therefore, using PMA task (Bravo-Rivera et al., 2014; Diehl et al., 2019; Bravo-Rivera and Sotres-Bayon,

2020), we tested the effect of LHb inactivation when rats are challenged to choose between taking action to avoid a threat or taking action to approach food guided by competing coexisting threat and safety memories. After being trained to press a lever to obtain food, rats were trained for 10 d to learn to avoid a threat (foot-shock) signaled by a tone, by stepping into the safe platform (Fig. 5A). During early PMA training (day 2), rats acquired classical conditioning (tone-shock threat association), but barely any instrumental learning (tone-platform safety association), as indicated by moderate levels of freezing and relatively low levels of avoidance responses ($t_{(28)} = 0.42, p = 0.67$; Fig. 5B), respectively. In contrast, by late PMA (day 10), freezing responses remained similar to early PMA (34.49% on day 2 vs 44.71% on day 10; $t_{(28)} = -1.56, p = 0.12$), but avoidance responses dramatically increased (30.00% on day 2 vs 83.33% on day 10; $t_{(28)} = -4.67, p < 0.00006$), as indicated by moderate levels of freezing and high levels of avoidance responses (freezing: 44.71% and avoidance: 83.333%; $t_{(28)} = -4.95, p < 0.00006$). These results suggest the formation of a tone threat memory occurs during early PMA, whereas the establishment of a tone safety memory during late PMA. Finally, the next day (day 11), rats were infused with either SAL or M&B into the LHb and tested for choice behavior (avoid or approach to obtain food) guided by competing threat and safety memories. Notably, we found that LHb inactivation before PMA retrieval test, impaired defensive responses, as indicated by decreased freezing and avoidance responses of the experimental group as compared with control group during PMA test [freezing: SAL: 29.85%, M&B: 5.22%; $t_{(13)} = -2.73, p = 0.01$ (Fig. 5C); avoidance SAL: 59.26%, M&B: 15.39%; $t_{(13)} = -3.00, p = 0.01$ (Fig. 5D1)]. Although showing a similar decrease trend, averaged lever press suppression ratio during test was not significantly different after inactivation (SAL: 0.63, M&B: 0.25; $t_{(13)} = 1.85, p = 0.08$; Fig. 5C, inset). However, analyzing the percent time spent on the platform during the tone and the suppression ratio in 6-s bins, revealed that LHb inactivation blocked both avoidance and suppression ratios (i.e., inactivation facilitated lever press suppressing during tone compared with pretone) compared with animals in the control group [time in platform: $F_{(1,13)} = 7.50, p = 0.01$; *post hoc* comparisons: -6 to -1 s, $p = 0.71$; $0-6$ s, $p = 0.23$; $7-12$ s, $p = 0.0048$; $13-18$ s, $p = 0.0008$; $19-24$ s, $p = 0.007$; $25-30$ s, $p = 0.02$ (Fig. 5D2); suppression ratio: $F_{(1,13)} = 6.55, p = 0.02$; *post hoc* comparisons: $0-6$ s, $p = 0.32$; $7-12$ s, $p = 0.11$; $13-18$ s, $p = 0.0042$, $19-24$ s, $p = 0.03$; $25-30$ s, $p = 0.44$ (Fig. 5D, inset)]. In sum, LHb inactivation biased the ability to actively choose between avoiding a threat or approaching food, toward driving reward-seeking behavior, suggesting that LHb is necessary to bias choice toward the promotion of defensive responses when competing threat and safety memories guide motivated behavior.

Discussion

We investigated the conditions under which LHb is necessary to regulate defensive responses to a threat. By combining pharmacological inactivations with various behavioral paradigms in rats, including tasks that involve

simultaneous retrieval of competing threat and safety memories, our study reveals a previously unknown role for the LHb in defensively responding to a cue that predicts outcomes with opposing emotional valences (threat and safety) during conflict. These findings add to a growing body of evidence showing that LHb is involved in the regulation of aversively motivated behaviors and highlight emotional conflict as a condition under which this brain region is critical to promote defensive responses.

LHb promotes defensive strategies during threat/safety memory conflict

Even after successful extinction learning to threat, conditioned defensive responses often return with the simple passage of time (Rescorla, 2004; Sotres-Bayon et al., 2006), even after a single day (Quirk, 2002). By using c-Fos as neural activity marker, a previous study identified that high LHb activity is positively correlated with high threat recovery after extinction (Martínez-Canabal et al., 2019). Consistently, in this study, we found that LHb inactivation prevents the recovery of extinguished defensive responses. Together, these findings indicate that LHb is not only recruited but is necessary to prevent the expression of the extinction memory thereby allowing defensive responses to return after extinction.

LHb activity may normally prevent the retrieval of safety memories in the service of driving defensive responses by suppressing downstream structures involved in appetitive motivated behaviors. A recent study found that optogenetic stimulation of dopaminergic activity in the ventral tegmental area (VTA), a prominent LHb projection site, facilitates extinction memory (Salinas-Hernández et al., 2018). Another recent study showed that chemogenetic inhibition of serotonergic activity of dorsal raphe receiving LHb input provides animals with resilience during aversive conditions (Varga et al., 2003; Andalman et al., 2019). Because LHb is known to potently inhibit brainstem dopaminergic and serotonergic activity (Varga et al., 2003; Matsumoto and Hikosaka, 2007; Lammel et al., 2012; Andalman et al., 2019), it is possible that suppressing LHb activity disinhibits these monoaminergic pathways thereby facilitating retrieval of safety memories (extinction and latent inhibition) and resilience in aversive conditions. In line with these findings, we suggest that LHb activity normally prevents expression of the extinction memory possibly by inhibiting VTA dopaminergic activity in the service of signaling the prevailing threat memory during recovery. This interpretation is further consistent with recent findings that indicate that LHb activity increases under aversive conditions, leading individuals toward negative expectations (Shabel et al., 2019). Furthermore, blockade of LHb activity with ketamine results in antidepressant effects (Yang et al., 2018; Cui et al., 2019) and decreased LHb activity mediated by enhanced neurogenesis prevents threat recovery (Martínez-Canabal et al., 2019). Thus, we suggest that when LHb is suppressed (with pharmacological inactivation, ketamine or enhanced neurogenesis), the negative expectation signal (worse than expected or “pessimism”) is blocked (likely by disinhibiting monoaminergic pathways involved in motivation),

thereby allowing individuals to be able to explore other options such as approaching food when available.

Extinction allows to evaluate how coexisting threat and extinction memories compete for the control of defensive responses (Rescorla, 2001; Myers and Davis, 2002; Quirk, 2002; Quirk and Mueller, 2008; Herry et al., 2010; Martínez-Canabal et al., 2019), and our findings suggest that the LHb is a critical brain region necessary to promote defensive responses during retrieval of conflicting threat and extinction memory. This interpretation is consistent with the idea that LHb activity is shaped by previous aversive and appetitive emotional associations (Wang et al., 2017) and that experience-dependent modifications in this brain region are necessary for the selection of defensive responses (Amo et al., 2014). Together, these findings suggest the possibility that LHb is involved in promoting defensive responses in conditions where memory retrieval is guided by coexisting previous aversive and appetite experiences. Another condition that allows us to evaluate the competition of threat and safety memories, although in the inverse order, is following latent inhibition. We found that independently of the order of acquisition of threat and safety learning, LHb is necessary to guide defensive responses mediated by the competition of coexisting emotional experiences (threat vs safety or safety vs threat). Thus, together these results indicate that, LHb may not mediate recovery of extinguished defensive responses per se but rather the promotion of threat-related behaviors in retrieval events involving competition of threat and safety memories. Further support for this conclusion, could include experiments that involve testing cued memory retrieval after extinguishing in a different context, as well as assessing threat/safety conflict retrieval using two separately trained cues (e.g., tone for threat and light for safety), rather than one (same tone for threat and safety).

In future studies, it will be important to characterize how information about threat and safety memories are integrated at the LHb to regulate defensive responses during conflict. LHb receives strong projections from regions of the medial prefrontal cortex that are involved in dual control of defensive responses (Kim and Lee, 2012). The prefrontal region promotes conditioned defensive responses, whereas the infralimbic prefrontal region suppresses them (for review, see Sotres-Bayon and Quirk, 2010). Further, recent studies showed that prefrontal connectivity with LHb is crucial for flexibly responding to learned information (Mathis et al., 2017; Mathis and Lecourtier, 2017). This raises the possibility that a prefrontal-habenular circuit may flexibly control defensive responses when threat and safety memories are in conflict.

LHb promotes defensive responses during conflict-mediated choice behavior

Our finding that LHb is necessary for retrieval of PMA is consistent with previous studies that show that LHb is necessary for avoidance learning (Wilcox et al., 1986; Thornton and Bradbury, 1989). However, PMA differs from traditional avoidance tasks in that it uses choice behavior to evaluate competing emotional memories during

conflict (Bravo-Rivera et al., 2014; Diehl et al., 2019; Bravo-Rivera and Sotres-Bayon, 2020). During PMA training, a platform acquires a positive motivational value (safety) while the grid acquires a negative value (threat). Then rats are challenged, during PMA retrieval (no shock delivered), to decide, guided by competing emotional memories signaled by a tone, whether to step onto the safe platform or press a lever to obtain food. Normally, rats choose to avoid the shock by stepping into the platform, however Lhb inactivated rats pressed the lever to obtain food despite the threat. This finding suggests that Lhb is necessary to promote defensive responses over reward-seeking behavior during conflict choice guided by memories with opposing motivational valences (threat and safety memories).

A previous study reported increase activity of dopaminergic neurons that allow successful avoidance responses (Oleson et al., 2012). The Lhb inhibits dopaminergic VTA activity, through GABAergic neurons in the tail of this brain structure (the rostromedial tegmental nucleus), promoting defensive responses, thereby putting a “break” on reward-seeking (Jhou et al., 2009; Quirk and Sotres-Bayon, 2009; Proulx et al., 2018). Our pharmacological inhibition of the Lhb may allow disinhibition of VTA dopaminergic activity leading to a facilitation of reward-seeking thereby making the individual more prone to risky behaviors. This is consistent with a previous study showing that Lhb inactivation increased hesitation to make a choice between risky reward options associated with different subjective values (Stopper and Floresco, 2014) and the notion that Lhb is involved in guiding survival decisions based on stimuli with learned motivation value (Hikosaka, 2010; Baker et al., 2016). Thus, our PMA findings support the notion that Lhb is critical for biasing choice behavior mediated by value-based decision-making and highlight its fundamental role in promoting defensive behavioral strategies during conflict-mediated choice behavior.

Lhb as a critical node in emotional conflict

Overall, our study reveals that emotional memory conflict is a fundamental survival condition under which Lhb is required to promote defensive strategies. This conclusion is consistent with the emerging notion that Lhb acts as a critical node in the control of emotional behaviors guided by aversive events in health and disease, at least in part, mediated by regulating downstream midbrain dopaminergic and serotonergic structures (Hu et al., 2020). We propose that during emotional conflict, Lhb activity is required to bias experience-dependent emotional behavior toward defensive behavioral responses and away from reward-seeking behavior, likely by suppressing downstream structures involved in appetitive motivated behaviors. Accordingly, a lack of activity in Lhb during emotional conflict results in a shift toward reward-seeking behavior and away from defensive responding, likely through disinhibition of downstream structures involved in appetitive motivated behaviors. Identifying the brain regions embedded in a complex network that are required for conflict-mediated behavioral responses, may be key for understanding how the brain balances information

about competing emotional memories to adaptively regulate emotional behaviors in health and disease.

References

- Amo R, Fredes F, Kinoshita M, Aoki R, Aizawa H, Agetsuma M, Aoki T, Shiraki T, Kakinuma H, Matsuda M, Yamazaki M, Takahoko M, Tsuboi T, Higashijima S, Miyasaka N, Koide T, Yabuki Y, Yoshihara Y, Fukai T, Okamoto H (2014) The habenulo-raphe serotonergic circuit encodes an aversive expectation value essential for adaptive active avoidance of danger. *Neuron* 84:1034–1048.
- Andalman AS, Burns VM, Lovett-Barron M, Broxton M, Poole B, Yang SJ, Grosenick L, Lerner TN, Chen R, Benster T, Mourrain P, Levoy M, Rajan K, Deisseroth K (2019) Neuronal dynamics regulating brain and behavioral state transitions. *Cell* 177:970–985.e20.
- Baker PM, Jhou T, Li B, Matsumoto M, Mizumori SJ, Stephenson-Jones M, Vicentic A (2016) The lateral habenula circuitry: reward processing and cognitive control. *J Neurosci* 36:11482–11488.
- Baker PM, Raynor SA, Francis NT, Mizumori SJ (2017) Lateral habenula integration of proactive and retroactive information mediates behavioral flexibility. *Neuroscience* 345:89–98.
- Bravo-Rivera C, Sotres-Bayon F (2020) From isolated emotional memories to their competition during conflict. *Front Behav Neurosci* 14:36.
- Bravo-Rivera C, Roman-Ortiz C, Brignoni-Perez E, Sotres-Bayon F, Quirk GJ (2014) Neural structures mediating expression and extinction of platform-mediated avoidance. *J Neurosci* 34:9736–9742.
- Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ (2002) Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev* 26:321–352.
- Cui Y, Hu S, Hu H (2019) Lateral habenular burst firing as a target of the rapid antidepressant effects of ketamine. *Trends Neurosci* 42:179–191.
- Diehl MM, Bravo-Rivera C, Quirk GJ (2019) The study of active avoidance: a platform for discussion. *Neurosci Biobehav Rev* 107:229–237.
- Elliot AJ (2008) *Handbook of approach and avoidance motivation*. New York: Psychology Press.
- Heldt SA, Ressler KJ (2006) Lesions of the habenula produce stress- and dopamine-dependent alterations in prepulse inhibition and locomotion. *Brain Res* 1073–1074:229–239.
- Herry C, Ferraguti F, Singewald N, Letzkus JJ, Ehrlich I, Lüthi A (2010) Neuronal circuits of fear extinction. *Eur J Neurosci* 31:599–612.
- Hikosaka O (2010) The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat Rev Neurosci* 11:503–513.
- Hu H, Cui Y, Yang Y (2020) Circuits and functions of the lateral habenula in health and in disease. *Nat Rev Neurosci* 21:277–295.
- Ilango A, Shumake J, Wetzel W, Scheich H, Ohl FW (2013) Electrical stimulation of lateral habenula during learning: frequency-dependent effects on acquisition but not retrieval of a two-way active avoidance response. *PLoS One* 8:e65684.
- Jhou TC, Fields HL, Baxter MG, Saper CB, Holland PC (2009) The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron* 61:786–800.
- Kim U, Lee T (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* 35:1253–1269.
- Lacagnina AF, Brockway ET, Crovetti CR, Shue F, McCarty MJ, Sattler KP, Lim SC, Santos SL, Denny CA, Drew MR (2019) Distinct hippocampal engrams control extinction and relapse of fear memory. *Nat Neurosci* 22:753–761.
- Lammel S, Lim BK, Ran C, Huang KW, Betley MJ, Tye KM, Deisseroth K, Malenka RC (2012) Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491:212–217.

- Lammel S, Lim BK, Malenka RC (2014) Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology* 76:351–359.
- Lecca S, Meye FJ, Trusel M, Tchenio A, Harris J, Schwarz MK, Burdakov D, Georges F, Mameli M (2017) Aversive stimuli drive hypothalamus-to-habenula excitation to promote escape behavior. *Elife* 6:e30697.
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155–184.
- Li H, Pullmann D, Zhou TC (2019) Valence-encoding in the lateral habenula arises from the entopeduncular region. *Elife* 8:e41223.
- Lingawi NW, Westbrook RF, Laurent V (2017) Extinction and latent inhibition involve a similar form of inhibitory learning that is stored in and retrieved from the infralimbic cortex. *Cereb Cortex* 27:5547–5556.
- Martínez-Canabal A, López-Oropeza G, Gaona-Gamboa A, Ballesteros-Zebadua P, de la Cruz OG, Moreno-Jimenez S, Sotres-Bayon F (2019) Hippocampal neurogenesis regulates recovery of defensive responses by recruiting threat- and extinction-signalling brain networks. *Sci Rep* 9:2939.
- Mathis V, Lecourtier L (2017) Role of the lateral habenula in memory through online processing of information. *Pharmacol Biochem Behav* 162:69–78.
- Mathis V, Barbelivien A, Majchrzak M, Mathis C, Cassel JC, Lecourtier L (2017) The lateral habenula as a relay of cortical information to process working memory. *Cereb Cortex* 27:5485–5495.
- Matsumoto M, Hikosaka O (2007) Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* 447:1111–1115.
- Matsumoto M, Hikosaka O (2009) Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. *Nat Neurosci* 12:77–84.
- Myers KM, Davis M (2002) Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron* 36:567–584.
- Namburi P, Al-Hasani R, Calhoon GG, Bruchas MR, Tye KM (2016) Architectural representation of valence in the limbic system. *Neuropsychopharmacology* 41:1697–1715.
- Oleson EB, Gentry RN, Chioma VC, Cheer JF (2012) Subsecond dopamine release in the nucleus accumbens predicts conditioned punishment and its successful avoidance. *J Neurosci* 32:14804–14808.
- Proulx CD, Hikosaka O, Malinow R (2014) Reward processing by the lateral habenula in normal and depressive behaviors. *Nat Neurosci* 17:1146–1152.
- Proulx CD, Aronson S, Milivojevic D, Molina C, Loi A, Monk B, Shabel SJ, Malinow R (2018) A neural pathway controlling motivation to exert effort. *Proc Natl Acad Sci USA* 115:5792–5797.
- Quirk GJ (2002) Memory for extinction of conditioned fear is long-lasting and persists following spontaneous recovery. *Learn Mem* 9:402–407.
- Quirk GJ (2007) *Handbook of emotion regulation*. New York: Guilford Press.
- Quirk GJ, Mueller D (2008) Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33:56–72.
- Quirk GJ, Sotres-Bayon F (2009) Signaling aversive events in the midbrain: worse than expected. *Neuron* 61:655–656.
- Quirk GJ, Russo GK, Barron JL, Lebron K (2000) The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished fear. *J Neurosci* 20:6225–6231.
- Rangel A, Camerer C, Montague PR (2008) A framework for studying the neurobiology of value-based decision making. *Nat Rev Neurosci* 9:545–556.
- Rescorla RA (2001) Retraining of extinguished Pavlovian stimuli. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 27:115–124.
- Rescorla RA (2004) Spontaneous recovery. *Learn Mem* 11:501–509.
- Salinas-Hernández XI, Vogel P, Betz S, Kalisch R, Sigurdsson T, Duvarci S (2018) Dopamine neurons drive fear extinction learning by signaling the omission of expected aversive outcomes. *Elife* 7:e38818.
- Shabel SJ, Wang C, Monk B, Aronson S, Malinow R (2019) Stress transforms lateral habenula reward responses into punishment signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 116:12488–12493.
- Shumake J, Ilango A, Scheich H, Wetzel W, Ohl FW (2010) Differential neuromodulation of acquisition and retrieval of avoidance learning by the lateral habenula and ventral tegmental area. *J Neurosci* 30:5876–5883.
- Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ (2011) Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 36:529–538.
- Song M, Jo YS, Lee YK, Choi JS (2017) Lesions of the lateral habenula facilitate active avoidance learning and threat extinction. *Behav Brain Res* 318:12–17.
- Sotres-Bayon F, Quirk GJ (2010) Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Curr Opin Neurobiol* 20:231–235.
- Sotres-Bayon F, Cain CK, LeDoux JE (2006) Brain mechanisms of fear extinction: historical perspectives on the contribution of prefrontal cortex. *Biol Psychiatry* 60:329–336.
- Sotres-Bayon F, Sierra-Mercado D, Pardiella-Delgado E, Quirk GJ (2012) Gating of fear in prefrontal cortex by hippocampal and amygdala inputs. *Neuron* 76:804–812.
- Stamatakis AM, Stuber GD (2012) Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance. *Nat Neurosci* 15:1105–1107.
- Stephenson-Jones M, Bravo-Rivera C, Ahrens S, Furlan A, Xiao X, Fernandes-Henriques C, Li B (2020) Opposing contributions of GABAergic and glutamatergic ventral pallidal neurons to motivational behaviors. *Neuron* 105:921–933.e5.
- Stopper CM, Floresco SB (2014) What's better for me? Fundamental role for lateral habenula in promoting subjective decision biases. *Nat Neurosci* 17:33–35.
- Thornton EW, Bradbury GE (1989) Effort and stress influence the effect of lesion of the habenula complex in one-way active avoidance learning. *Physiol Behav* 45:929–935.
- Tian J, Uchida N (2015) Habenula lesions reveal that multiple mechanisms underlie dopamine prediction errors. *Neuron* 87:1304–1316.
- Tomaiuolo M, Gonzalez C, Medina JH, Piriz J (2014) Lateral Habenula determines long-term storage of aversive memories. *Front Behav Neurosci* 8:170.
- Trusel M, Nuno-Perez A, Lecca S, Harada H, Lalive AL, Congiu M, Takemoto K, Takahashi T, Ferraguti F, Mameli M (2019) Punishment-predictive cues guide avoidance through potentiation of hypothalamus-to-habenula synapses. *Neuron* 102:120–127.e4.
- Vale-Martínez A, Martí-Nicolovius M, Guillazo-Blanch G, Coll-Andreu M, Morgado-Bernal I (1997) Effects of habenular lesions upon two-way active avoidance conditioning in rats. *Neurobiol Learn Mem* 68:68–74.
- Varga V, Kocsis B, Sharp T (2003) Electrophysiological evidence for convergence of inputs from the medial prefrontal cortex and lateral habenula on single neurons in the dorsal raphe nucleus. *Eur J Neurosci* 17:280–286.
- Vincenz D, Wernecke KEA, Fendt M, Goldschmidt J (2017) Habenula and interpeduncular nucleus differentially modulate predator odor-induced innate fear behavior in rats. *Behav Brain Res* 332:164–171.
- Wang D, Li Y, Feng Q, Guo Q, Zhou J, Luo M (2017) Learning shapes the aversion and reward responses of lateral habenula neurons. *Elife* 6:e23045.
- Wilcox KS, Christoph GR, Double BA, Leonzio RJ (1986) Kainate and electrolytic lesions of the lateral habenula: effect on avoidance responses. *Physiol Behav* 36:413–417.
- Yang Y, Cui Y, Sang K, Dong Y, Ni Z, Ma S, Hu H (2018) Ketamine blocks bursting in the lateral habenula to rapidly relieve depression. *Nature* 554:317–322.