



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

*LA VÍA PREFRONTAL-ACCUMBENS REGULA EL ACTO DE CONFRONTAR
AMENAZAS EN BÚSQUEDA DE UNA RECOMPENSA*

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
PRESENTA
PSIC. ELIZABETH SARAHI ILLESCAS HUERTA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. FRANCISCO SOTRES BAYÓN
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTOR:
DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

CIUDAD DE MÉXICO, MAYO, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos:

Agradezco a mi tutor, el Dr. Francisco Sotres Bayón por permitirme realizar mis estudios de doctorado en su laboratorio y por todas las enseñanzas adquiridas bajo su tutoría.

A la Dra. Leticia Ramírez Lugo por todo el apoyo teórico y técnico brindado durante la realización de este trabajo. Gracias por siempre contagiarme de tu gusto por la investigación.

A mi comité tutorial, el Dr. Fernando Peña Ortega y el Dr. Federico Bermúdez Rattoni, por todas las aportaciones que realizaron durante el desarrollo de este trabajo.

Quiero agradecer a los miembros del jurado, La Dra. Lourdes Massieu Trigo, la Dra. Claudia Gómez Acevedo, el Dr. José Alonso Fernández Guasti y el Dr. Luis Alberto Telléz Lima, por las valiosas observaciones que enriquecieron el escrito de esta tesis.

Al Dr. Federico Bermúdez Rattoni por invitarnos a aprender la técnica de optogenética. En especial, agradezco a su estudiante el M. C. Jorge Eduardo Hernández Ortíz por ayudarnos a implementar esta técnica en el laboratorio y al desarrollo de una parte experimental de este trabajo. Agradezco profundamente todo el conocimiento compartido.

A los miembros del laboratorio, en especial a Félix Sierra por siempre ayudarnos a mantener el laboratorio en óptimas condiciones para realizar el trabajo experimental.

Al Ingeniero Adrián Hernández Alva quien nos ayudó a desarrollar equipo conductual utilizado en este trabajo.

A la unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en especial a la Dra. Yazmín Ramiro Cortés por la asesoría brindada en la adquisición de microfotografías que se muestran en esta tesis.

Agradezco a la M.V.Z. Claudia Rivera Cerecedo, al M.V.Z. Héctor Alfonso Malagón Rivero y al personal del vivarium y del bioterio del Instituto de Fisiología Celular por el mantenimiento y cuidado de los animales.

A la M. C. Ana María Escalante, al Ing. Francisco Pérez Eugenio y a la unidad de cómputo del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado durante el desarrollo de este trabajo doctoral (Beca 736773).

Al programa de Ciencias Biomédicas y a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitir mi formación académica.

Agradezco profundamente a mi familia por todo el apoyo brindado durante la realización de este proyecto. A mi madre Isabel Huerta por siempre motivarme a seguir adelante y a mis hermanas Valeria y Mireya por creer en mí. La culminación de este doctorado es gracias a ustedes.

A mis amigos con los que he compartido parte de esta historia: Jenny, Oscar, Nubia, Lety.

A mi mejor amigo Gabriel Carmona por siempre estar presente.

A Eduardo Hernández por el apoyo incondicional de los últimos tiempos.

ÍNDICE

RESUMEN	6
Lista de abreviaturas.....	7
1.Introducción	10
2.Antecedentes.....	13
2.1 Corteza Prefrontal Medial.....	13
2.1.1 Anatomía y conectividad	13
2.1.2 La Corteza Prelímbica codifica estímulos que predicen amenazas y regula la expresión de respuestas aversivas.....	16
2.1.3 La Corteza Prelímbica codifica estímulos que predicen recompensas y regula la conducta apetitiva	20
2.2 Núcleo Accumbens.....	23
2.2.1 Anatomía y conectividad.....	23
2.2.2 El Núcleo Accumbens codifica estímulos que indican amenaza y regula la conducta de aversión.....	25
2.2.3 El Núcleo Accumbens codifica estímulos que indican recompensas y regula la conducta apetitiva	27
2.3 Comunicación funcional de la Corteza Prelímbica y el Núcleo Accumbens.....	30
3. Planteamiento del problema	33
3.1 Pregunta de investigación.....	34
3.2 Hipótesis	34
3.3 Objetivo general	34
4.Método.....	35
4.1 Sujetos	35
4.2 Tareas conductuales	35
4.3 Administración sistémica de diazepam	47
4.4 Cirugías estereotáxicas.....	47
4.5 Inactivaciones farmacológicas temporales	48
4.6 Parámetros de inhibición optogenética	48
4.7 Análisis histológico y adquisición de microfotografías	49
4.8 Adquisición y análisis de datos.....	50

5.Resultados	52
5.1 Sección experimental I	53
5.1.1 El diazepam facilita los cruces de conflicto sin afectar los cruces en ausencia de conflicto	55
5.1.2 El diazepam facilita la conducta de descenso durante la prueba de conflicto sin afectar el no conflicto.....	60
5.1.3 El diazepam facilita la conducta innata de forrajeo durante la prueba de conflicto sin afectar la prueba de no conflicto.....	64
5.2 Sección experimental II	67
5.2.1 La inactivación de la Corteza Prelímbica facilita la confrontación de amenazas señalizadas para buscar recompensas.....	68
5.2.2 La inactivación del Núcleo Accumbens anterior mejora la confrontación de amenazas para buscar recompensas durante conflictos innatos y aprendidos	75
5.2.3. La inactivación del Núcleo Accumbens posterior impide la búsqueda de recompensas cuando se debe realizar una respuesta instrumental en presencia y ausencia de conflicto	82
5.2.4 La fotoinhibición de la vía corteza PL → NAcc anterior mejora la búsqueda de recompensas a pesar de la presencia de una amenaza aprendida	87
6.Discusión.....	93
6.1 Validación de las tareas de conflicto	94
6.1.1 Tareas de conflicto motivacional.....	94
6.1.2 El diazepam durante la competencia de motivaciones.....	96
6.2 Mecanismos cerebrales que participan en la regulación de la conducta durante situaciones de conflicto.....	98
6.2.1 La Corteza Prelímbica es necesaria para frenar la confrontación de una señal de amenaza durante la búsqueda de recompensas.....	98
6.2.2 El Núcleo Accumbens anterior es necesario para frenar la confrontación de una amenaza, aprendida o innata, cuando compite con la búsqueda de recompensas.....	100
6.2.3 El Núcleo Accumbens posterior es necesario para la búsqueda de recompensas que involucran la ejecución de respuestas instrumentales ante condiciones de conflicto y no conflicto aprendido.....	103
6.2.4 La Corteza Prelímbica regula el acto de enfrentar amenazas para obtener recompensas a través de su comunicación con el Núcleo Accumbens	105
7.Conclusión.....	110
Bibliografía.....	111

RESUMEN

La habilidad para evitar amenazas y acercarse a recompensas es vital para la supervivencia. Sin embargo, en la naturaleza estos sistemas motivacionales opuestos compiten frecuentemente por el control de la conducta. Cuando las amenazas y las recompensas se presentan de manera simultánea los animales enfrentan situaciones de conflicto que requieren de la evaluación de las opciones disponibles en el ambiente para responder apropiadamente (aproximación o evitación). Aunque se conoce bastante sobre el sustrato neuronal que permite responder (de manera innata o aprendida) ante la presencia individual de amenazas y recompensas, poco se sabe de los mecanismos cerebrales que regulan la conducta durante condiciones de conflicto. Por ejemplo, se ha descrito que la Corteza Prelímbica (PL) y el Núcleo Accumbens (NAcc) procesan información que está relacionada con la presencia aislada de amenazas o recompensas; no obstante, se desconoce si estas estructuras son necesarias para regular la búsqueda de recompensas cuando éstas compiten con la presencia de amenazas. Para evaluar si la corteza PL y el NAcc son necesarios para responder bajo condiciones de conflicto, primero desarrollamos tres tareas conductuales para probar la conducta de roedores bajo condiciones de conflicto. Nuestras tareas de conflicto tienen la particularidad de desafiar a ratas a confrontar activamente amenazas para obtener recompensas guiadas por estímulos innatos o aprendidos. Inicialmente, utilizamos la administración sistémica de diazepam para validar que nuestras tareas permiten evaluar la conducta bajo conflicto motivacional. Encontramos que, sin importar si los estímulos en competencia generaron respuestas innatas o aprendidas, una dosis baja de diazepam facilitó la búsqueda de recompensas a pesar de la presencia de amenazas durante el conflicto, sin afectar la conducta en ausencia de conflicto. Posteriormente, evaluamos si la corteza PL y el NAcc son necesarios para regular la confrontación de amenazas por la búsqueda de recompensas durante situaciones de conflicto. Observamos que la desactivación temporal de la corteza PL y el NAcc anterior (aNAcc) facilitó la búsqueda de recompensas a pesar de la presencia de amenazas durante el conflicto, pero no afectó la conducta en ausencia de conflicto. Por su parte, la desactivación del NAcc posterior (pNAcc) impidió la ejecución de respuestas instrumentales por recompensas durante condiciones de conflicto y no conflicto. Finalmente, evaluamos si la comunicación aferente de la corteza PL hacia el aNAcc es necesaria para responder bajo condiciones de conflicto. Encontramos que la fotoinhibición de los axones de la corteza PL en el aNAcc facilitó la búsqueda de recompensas a pesar de la presencia de una amenaza señalizada durante el conflicto sin afectar la conducta en ausencia de conflicto. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la corteza PL regula el acto de confrontar amenazas cuando éstas compiten con la búsqueda de recompensas a través de su correcta comunicación con el aNAcc.

Lista de abreviaturas

ACa: Área del cíngulo anterior

AGP: Área Gris Periacueductual

AL: Amígdala lateral

Arch: Arqueorodopsina

ATV: Área Tegmental Ventral

BA: Amígdala basal

BLA: Amígdala basolateral

ca: Comisura anterior

CamKII: Calcio Calmodulina cinasa II

ChR2: Canal de rodopsina 2

CE: Amígdala Central

COF: Corteza orbitofrontal o Corteza

CPF: Corteza Prefrontal

CPFdl: Corteza Prefrontal dorsolateral

CPFm: Corteza Prefrontal medial

CPFvm: Corteza Prefrontal ventromedial

db: decibeles

D1: receptores de dopamina tipo 1

D2: receptores de dopamina tipo 2

DZPM: Diazepam

eYFP: Proteína amarillo fluorescente

GABA: Ácido Gamma Aminobutírico

HV: Hipocampo Ventral

IL: Infralímbica

ITI: Inter estímulo

IV: Intervalo variable

LA: Amígdala Lateral

LB: Línea Base

mA: miliampers

NAcc: Núcleo accumbens

aNAcc: Núcleo Accumbens anterior

pNAcc: Núcleo Accumbens posterior

NEM: Neuronas espinosas medianas

PL: Prelímbica

PV: Pálido Ventral

RF1: Razón Fija 1

SAL: Salina

M&B: Muscimol y baclofeno

VO: Orbital Ventral

Lista de figuras

Figura 1. Representación anatómica de la CPF.....	14
Figura 2. La corteza PL codifica información de estímulos que predicen amenazas	18
Figura 3. La CPFm codifica de manera diferencial información de estímulos asociados con la entrega de recompensas	22
Figura 4. Subdivisión morfológica del NAcc y sus principales aferencias y eferencias.....	24
Figura 5. El NAcc codifica información aversiva y apetitiva de estímulos aprendidos e innatos	28
Figura 6. La vía PL→NAcc participa en la expresión de reacciones de defensa ante un estímulo que predice amenaza.....	32
Figura 7. Tareas de conflicto motivacional para estudiar el acto de confrontar amenazas en búsqueda de recompensas.....	47
Figura 8. El diazepam decrementa las latencias de cruces durante el conflicto sin afectar los ensayos de no conflicto	58
Figura 9. El diazepam decrementa las latencias de descenso durante la prueba de conflicto sin afectar la prueba de no conflicto.....	62
Figura 10. El diazepam incrementa la conducta de forrajeo durante condiciones de conflicto sin afectar el no conflicto.....	65
Figura 11. La inactivación de la corteza PL mejora la respuesta aprendida de búsqueda de recompensas sólo durante condiciones de conflicto	70
Figura 12. La inactivación de la corteza PL mejora la búsqueda de recompensas innatas sólo cuando compiten con amenazas señalizadas.....	73
Figura 13. La inactivación de la PL no afecta la conducta de forrajeo por comida ante amenazas innatas.	74
Figura 14. La inactivación del aNAcc mejora la respuesta aprendida de búsqueda de recompensas sólo durante condiciones de conflicto	77
Figura 15. La inactivación del aNAcc mejora la búsqueda de recompensas innatas sólo cuando compiten con amenazas señalizadas	79

Figura 16. La inactivación del aNAcc mejora la conducta de forrajeo por comida a pesar de la presencia de una amenaza innata.....	81
Figura 17. La inactivación del pNAcc impide la búsqueda de recompensas durante condiciones de conflicto y no conflicto.....	83
Figura 18. La inactivación del pNAcc no afecta la búsqueda de recompensas innatas en presencia de amenazas naturales y aprendidas	86
Figura 19. La fotoinhibición de la vía PL→NAcc mejora la búsqueda de recompensas sólo durante condiciones de conflicto	90
Figura 20. Circuito cerebral para regular el acto de confrontar amenazas en búsqueda de recompensas.	109

1.Introducción

Para sobrevivir, los animales han desarrollado sistemas motivacionales de conducta que les permite evitar amenazas y buscar recompensas. Esta habilidad requiere del uso de información referente al valor, ya sea innato o aprendido, que tienen los estímulos en el ambiente (valencia positiva/negativa) para regular la conducta (Tye 2018; Rangel., *et al*, 2008). Tradicionalmente, estos dos sistemas de valencia motivacional se han estudiado de manera aislada (Hu 2016). Las respuestas de defensa y de evitación que son generadas por la presencia de amenazas (Ledoux, 2000) se han estudiado de manera separada de la conducta de aproximación a las recompensas (Cardinal., *et al*. 2002).

No obstante, frecuentemente en la naturaleza las amenazas y las recompensas se presentan de manera simultánea, desafiando a los animales a responder bajo condiciones de conflicto motivacional (Aupperle and Paulus 2010; Choi and Kim 2010). Un conflicto motivacional ocurre cuando un individuo debe tomar una decisión guiada por estímulos de valencia motivacional opuesta (amenaza/recompensa) que requieren de la elección entre dos respuestas conductuales incompatibles (evitación/aproximación) (Corr 2013). Por ejemplo, una cebra que debe cruzar un río para continuar buscando alimento al mismo tiempo que es acechada por un depredador. En esta circunstancia, la cebra debe elegir entre evitar al depredador y perecer de hambre o cruzar el río para buscar comida a pesar de que pueda ser devorada. De este modo, durante un conflicto motivacional se reta a los individuos a elegir entre evitar amenazas bajo el costo de perder recompensas o acercarse a recompensas bajo el costo de enfrentar amenazas. A pesar de que se conoce bastante sobre cómo el cerebro responde ante la presentación independiente de amenazas y de recompensas, poco se sabe del sustrato neuronal que permite regular la conducta ante la presencia simultánea de motivaciones opuestas.

El estudio de las conductas motivadas bajo conflicto se ha abordado desde hace tiempo mediante el uso de tareas conductuales de aproximación/evitación. Estas tareas conductuales

Introducción

se caracterizaron por obligar a los animales (en su mayoría roedores) a suprimir la respuesta de búsqueda de recompensas (por lo regular, comida o agua endulzada) para evitar la presentación de un estímulo aversivo-doloroso (por lo general, una descarga eléctrica) (Estes and Skinner 1941; Vogel., *et al.*, 1971; Geller and Seifter 1960). En la mayoría de estas tareas se observó que la administración de drogas sistémicas de carácter inhibitorio (entre ellas las benzodiazepinas, barbitúricos, alcohol, etc.) incrementaba el número de eventos aversivos que los animales estaban dispuestos a soportar para acercarse a las recompensas (Kilts, Commissaris, and Rech 1981; Bailey and Miller 1952; Liljequist and Engel 1984). A partir de esto, los modelos de conflicto se empearon más como modelos animales ideales para medir ansiedad a nivel sistémico (Pollard GT 1990; Rasmussen 2006) pero no a nivel del sistema nervioso central.

En los últimos años, sin embargo, ha surgido un gran interés por el estudio de los sustratos neuronales que regulan la conducta bajo condiciones de conflicto. Gran parte de estos estudios han centrado su atención en entender el conflicto desde la conducta de evitación al utilizar modelos conductuales donde se castiga la búsqueda de recompensas. Por ejemplo, en la mayoría de las tareas actuales se simulan condiciones de conflicto al presentar un estímulo doloroso (normalmente una descarga eléctrica) al mismo tiempo que los animales ejecutan una acción (como presionar una palanca) para obtener una recompensa (Burgos-Robles *et al.* 2017a; Hamel *et al.* 2017; Dit-Bressel and McNally 2015; Bravo-Rivera *et al.* 2014). En otras tareas, el conflicto ocurre cuando se le pide a los animales elegir entre dos opciones de recompensa: una grande pero arriesgada o una pequeña pero segura (Friedman *et al.* 2015; St. Onge and Floresco 2010; Piantadosi *et al.* 2017; Orsini *et al.* 2016). Sin importar la condición utilizada, en los ejemplos previamente descritos los animales eligen evitar las amenazas bajo el costo de perder recompensas.

Otra forma de responder ante condiciones de conflicto, y que es muy frecuente en la naturaleza, es enfrentar activamente una amenaza para obtener recompensas. Sorprendentemente, se ha estudiado muy poco el sustrato neuronal que permite regular la

Introducción

conducta de elección para buscar recompensas a pesar de la presencia de amenazas. Esto se debe, en parte, a que no hay muchos modelos conductuales de conflicto en donde los animales elijan acercarse a las recompensas en lugar de evitarlas cuando éstas compiten con la presencia de amenazas.

En el laboratorio desarrollamos tres tareas de conflicto motivacional diseñadas para que los animales elijan enfrentar amenazas para poder obtener recompensas inmediatas. Estas tareas involucran una comparación de la conducta de elección durante la presencia y ausencia de conflicto en un mismo individuo y en grupos independientes de ratas. La principal diferencia entre las tres tareas de conflicto es el uso de estímulos aprendidos e innatos con valencias negativas o positivas para guiar la conducta. En una primera tarea (*conflicto mediado por cruces*) se utilizan señales condicionadas opuestas para retar a los animales a cruzar una parrilla electrificada con el fin de obtener comida en un sitio seguro. En otra tarea (*conflicto mediado por descenso*), se utiliza la combinación de estímulos condicionados e innatos para retar a los animales a bajar de un sitio seguro para encontrar una recompensa. Finalmente, en la tercera tarea (*conflicto innato mediado por forrajeo*) se utilizan estímulos innatos para retar a los animales a forrajear en una zona altamente iluminada.

Todas nuestras tareas de conflicto requieren que los animales elijan enfrentar amenazas para poder obtener recompensas. Esta conducta de elección requiere de un sistema de regulación conductual que propicie la ejecución adecuada de respuestas de aproximación-evitación durante situaciones de competencia motivacional. El desajuste en la regulación de la conducta bajo condiciones de conflicto se ha vinculado con la expresión de conductas mal adaptativas relacionadas con trastornos emocionales (Aupperle and Paulus 2010) y de impulsividad (Piantadosi et al. 2017). Una estructura cerebral que se ha propuesto como un nodo cognitivo para la integración de la información y la regulación de la conducta motivada es la Corteza Prefrontal medial (CPFm) y su correcta comunicación con otras estructuras subcorticales del cerebro, en especial con el NAcc (Pastor and Medina 2021).

2. Antecedentes

La presentación de conflictos motivacionales ocurren habitualmente en la naturaleza y su sustrato neuronal involucra la integración y coordinación de los sistemas de procesamiento aversivo (miedo) y apetitivo (recompensa) (Aupperle and Paulus 2010). Dos estructuras cerebrales que se han visto involucradas en procesar la información aversiva y apetitiva del ambiente son la CPFm, particularmente la región PL y el NAcc (Cardinal, Parkinson, Hall, *et al.* 2002). Ambas estructuras son necesarias para la correcta expresión de conductas relacionadas con la presencia de amenazas y de recompensas, así como en la correcta ejecución de conductas de elección en el ambiente (Walton *et al.*, 2002; Feja *et al.*, 2014). Por lo que, estas estructuras podrían ser necesarias para regular la conducta durante situaciones de conflicto que requieren enfrentar amenazas para obtener recompensas.

2.1 Corteza Prefrontal medial

2.1.1 Anatomía y conectividad

Anatómicamente la Corteza Prefrontal (CPF) se encuentra ubicada dentro del lóbulo frontal del cerebro y es definida como el área cortical que recibe proyecciones del núcleo medial dorsal del tálamo (Rose & Woolsey, 1948). En humanos la CPF comprende las áreas 8-13, 24,32,46 y 47 del mapa citoarquitectónico de Brodmann (Carlén 2017) y se divide en tres regiones principales: CPF dorsolateral (CPFdl), CPF ventromedial (CPFvm) y CPF orbital (COF). La CPFdl se ha descrito más como una corteza responsable de la organización temporal del comportamiento y el razonamiento, mientras que la CPFvm y COF se ha relacionado con el procesamiento emocional (Eichenbaum, 2017).

En roedores la CPF está conformada por una zona agranular dividida en dos zonas principales: la corteza prefrontal medial (CPFm) y la corteza orbitofrontal (COF). Básicamente, la COF se ha descrito como una corteza necesaria para la flexibilidad cognitiva (Wallis 2012), mientras que la CPFm se ha relacionado con el ajuste del comportamiento a partir de las

señales emocionales o motivacionales del ambiente (Sotres-Bayon, Cain, and LeDoux 2006). Por su parte, la CPFm se encuentra dividida en dos principales subregiones: la región dorsal, donde se encuentra el área del cíngulo anterior (ACa) y la región ventral, donde se localiza la corteza Prelímbica (PL), la corteza Infralímbica (IL) y la corteza Orbital Ventral (VO) (Uylings, Groenewegen, and Kolb 2003). A pesar de que mucho se ha discutido sobre la homología funcional de la CPFm de roedores con la CPF en humanos, diversos autores han coincidido con que la CPFm de los roedores presenta similitudes anatómicas y funcionales con la CPFdl de los humanos. Concretamente, las regiones Aca, PL e IL de la rata son homologas a las áreas 24, 32 y 25b del mapa citoarquitectónico de Brodmann en humanos (Wallis 2012) (**Figura 1**).

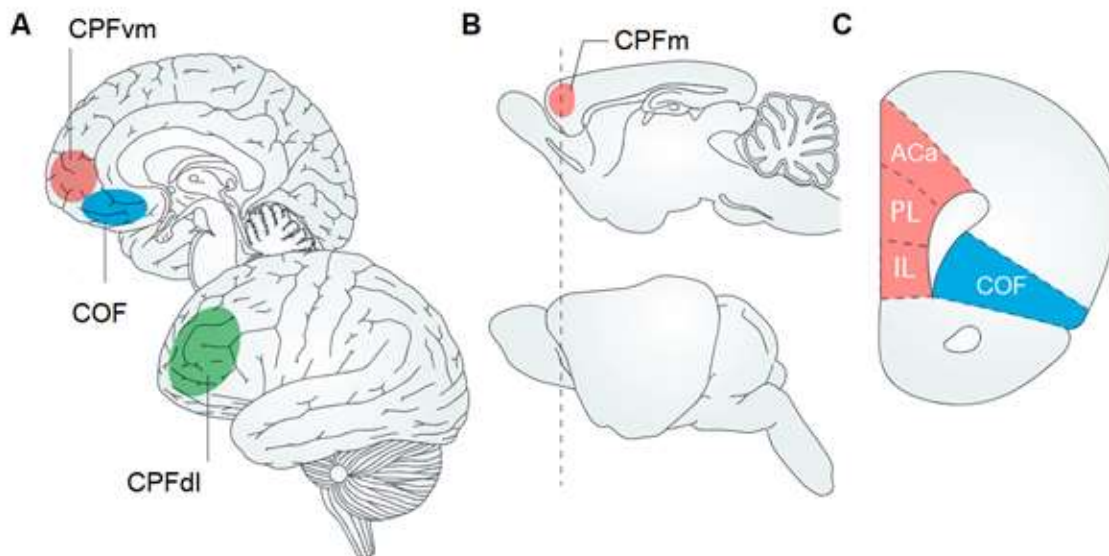


Figura 1. Representación anatómica de la CPF. **A**, La CPF en humanos se divide en: CPF ventromedial (CPFvm), CPF dorsolateral (CPFdl) y CPF orbital (COF). **B**, La CPF de roedores se divide en la CPF medial (CPFm) y la Corteza orbitofrontal (COF). **C**, A su vez, la CPFm de roedores se divide en el área del cíngulo anterior (ACa), la región prelímbica (PL) y la región Infralímbica (IL) (Modificado de Eichenbaum 2017).

La CPFm está organizada de manera laminar en 5 capas celulares (I, II/III, V y VI) que están conformadas por diversos subtipos de neuronas que se pueden clasificar en dos categorías principales: neuronas piramidales glutamatérgicas e interneuronas GABAérgicas (Somogyi et al. 1998). Las neuronas piramidales son de tipo excitatorias y representan el ~85%

Antecedentes

de la población neuronal que conforma a la CPFm. Los somas de estas neuronas se localizan en la mayoría de las capas corticales (capas II/III, V y VI) a excepción de la capa I donde no se encuentran somas de estas neuronas. Morfológicamente, las neuronas piramidales están conformadas por un soma de ~25-50 μm de diámetro, por un conjunto de dendritas basales ubicadas cerca del soma y por una dendrita apical que proyecta hacia las capas superficiales de la corteza (DeFelipe, Alonso-Nanclares, and Arellano 2002). De acuerdo con su patrón de disparo, las neuronas piramidales se han clasificado en tres grupos principales: piramidales de descarga regular (RS, *regular spiking cells*), piramidales con ráfagas inactivadoras (IB, *inactivating bursting cells*) y piramidales con ráfagas no inactivadoras (NIB, *non-inactivating bursting cells*) (Dégenétais *et al.* 2002).

Por su parte, las interneuronas son de tipo inhibitorias y representan sólo el ~15% de la población neuronal de la CPFm. A diferencia de las neuronas piramidales, las interneuronas se distribuyen homogéneamente en todas las capas corticales (Courtin *et al.* 2013). Estas neuronas se clasifican de acuerdo con su morfología en: neuronas comunes, en cesto (*basket cells*; clasificadas en grandes y pequeñas), en candelabro (*chandelier*) y en dos ramilletes (*doublebouquet*). De acuerdo con una clasificación neuroquímica las interneuronas se clasifican en: neuronas de calbindina (CB), neuronas de parvalbúmina (PV) y neuronas calretinina (CR). Por último, de acuerdo a su huella electrofisiológica éstas se clasifican en tres tipos: las inhibitorias de descarga rápida (FS o *fast-spiking cells*, que descargan tónicamente potenciales de acción sin adaptación), las de descarga regular (RS, que descargan con una marcada adaptación) y las de descarga irregular (IS o *irregular spiking cells*, que descargan en ráfagas con una frecuencia irregular) (Somogyi *et al.* 1998; DeFelipe, Alonso-Nanclares, and Arellano 2002; Giustino TF and Maren S 2015). La característica principal de las interneuronas es que ejercen un control inhibitorio local sobre la actividad excitatoria de las neuronas piramidales para así permitir un balance adecuado y funcional entre excitación e inhibición (DeFelipe, Alonso-Nanclares, and Arellano 2002). Este balance en la actividad eléctrica de la CPFm es necesario para permitir la regulación de diferentes procesos conductuales.

Antecedentes

En cuanto a su conectividad, la CPFm envía y recibe diferentes proyecciones de estructuras cerebrales relevantes que se han relacionado con la búsqueda de recompensas y la expresión de respuestas defensivas ante amenazas. De manera general, la CPFm se comunica recíprocamente con las siguientes estructuras: 1) el núcleo medial dorsal del tálamo, 2) con los ganglios basales, 3) con las neuronas dopaminérgicas y GABAérgicas del Área Tegmental Ventral (ATV), a su vez el ATV envía información dopaminérgica de regreso a la CPFm e información GABAérgica hacia el NAcc, 4) con la amígdala, preferentemente con la región PL e IL 5) y con el Hipocampo Ventral (HV). De manera no recíproca, la CPFm proyecta de manera directa hacia el NAcc, el Área Gris Periacueductual (AGP), la habénula lateral y el núcleo dorsal del rafe. Finalmente, la CPFm tiene densas proyecciones a nivel local. Por ejemplo, la corteza PL se conecta directamente con el Aca, mientras que la IL proyecta hacia la corteza PL y la parte dorsal del Aca (Vertes 2004; Courtin et al. 2013; Moorman et al. 2015; Pastor and Medina 2021). Gracias a estas características anatómicas y de conectividad la CPFm ha ganado un distintivo papel en la regulación de la conducta emocional.

2.1.2 La corteza Prelímbica codifica estímulos que predicen amenazas y regula la expresión de respuestas aversivas

Para estudiar en el laboratorio cómo responden los animales ante la presencia de estímulos que predicen amenazas se ha empleado el condicionamiento al miedo Pavloviano (Sotres-Bayon and Quirk 2010a). En este paradigma conductual los animales (normalmente roedores) son colocados en una caja operante donde se les presenta de manera repetida un estímulo neutro, por lo general un tono, seguido de una descarga eléctrica. Después del entrenamiento, los animales aprenden que el tono predice la descarga eléctrica y son capaces de expresar respuestas defensivas como la inmovilización cuando el tono se presenta en ausencia de la descarga eléctrica (Ledoux 2000). Diversos estudios han coincidido con que la amígdala es necesaria para que los animales adquieran y evoquen respuestas aversivas, sin embargo, actualmente también se ha descrito que la CPFm juega un papel crucial para la expresión y regulación de este tipo de respuestas (Sotres-Bayon & Quirk, 2010b).

Antecedentes

Los primeros estudios que lograron relacionar de manera concisa a la CPFm con el condicionamiento al miedo fueron realizados mediante el uso de registros electrofisiológicos de la actividad neuronal de esta estructura. En un estudio pionero, se entrenó a ratas en el condicionamiento al miedo y se registró la actividad neuronal de la CPFm durante una prueba en donde el tono ya había sido asociado como aversivo. Se observó un incremento de la actividad neuronal de la CPFm de manera pronunciada durante la presentación del tono aversivo, pero no en ausencia de éste. Este incremento en la actividad de la CPFm se vio relacionada con la expresión de la respuesta de inmovilización de los animales durante la prueba (Baeg *et al.* 2001), sugiriendo que la CPFm codifica información aversiva del ambiente.

Más adelante, se identificó una importante diferenciación entre la corteza PL e IL en el procesamiento de información aversiva. Milad y Quirk (2002) entrenaron a un grupo de ratas en el condicionamiento al miedo y registraron la actividad de la corteza IL en dos momentos importantes: después de que los animales aprendieron que el tono predecía la descarga eléctrica (evocación del condicionamiento) y después de que los animales aprendieron que el tono ya no predecía la descarga eléctrica (extinción del condicionamiento). Se observó un incremento de la actividad eléctrica de la corteza IL durante la presentación del tono en la extinción, pero no en la evocación, del condicionamiento (Milad and Quirk 2002).

Tiempo después, Burgos-Robles y colaboradores (2009) hicieron un experimento, similar al descrito anteriormente, donde encontraron que la actividad de la corteza PL incrementó de manera sostenida con la presentación del tono durante la evocación del condicionamiento al miedo, pero no durante la extinción. Este incremento en la actividad de la corteza PL se vio reflejada con la respuesta de inmovilización de los animales durante la presentación del tono (Burgos-Robles *et al.*, 2009). De modo que la corteza PL, pero no la corteza IL, codifica información sobre estímulos que predicen amenazas (**Figura 2**).

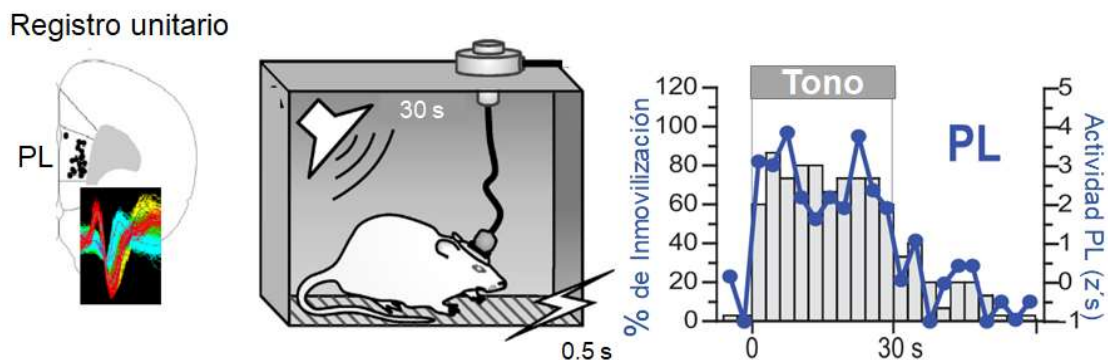


Figura 2. La corteza PL codifica información de estímulos que predicen amenazas. A, Esquema de registro unitario en la corteza PL durante la prueba de condicionamiento al miedo. B, El incremento de la respuesta de inmovilización de los animales durante la presencia del tono aversivo corresponde con el mismo incremento sostenido de la actividad eléctrica de la corteza PL (Modificado de Burgos-Robles *et al.*, 2009).

Consistente con lo anterior, diversos estudios han reportado que la actividad de la corteza PL, pero no la corteza IL, regula la expresión de reacciones de defensa ante la presencia de estímulos que predicen una amenaza (Peters, Kalivas, and Quirk 2009; Milad and Quirk 2012; Sotres-Bayon and Quirk 2010b). De manera general, se ha reportado que el bloqueo farmacológico de la actividad excitatoria de esta estructura disminuye la respuesta de inmovilización de los animales durante la evocación del condicionamiento (Sierra-Mercado *et al.*, 2011), pero no antes del condicionamiento (Adquisición) (Corcoran & Quirk, 2007) o después de la extinción (Laurent & Westbrook, 2009; Sierra-Mercado *et al.*, 2011). En contraparte, la estimulación eléctrica de la corteza PL incrementa los niveles de inmovilización durante la presentación del tono condicionado como aversivo (Vidal-Gonzalez *et al.* 2006); sugiriendo que esta estructura es suficiente para promover las respuestas defensivas ante amenazas.

En conjunto, la evidencia acumulada sobre la corteza PL y su participación en el condicionamiento al miedo sugiere que la actividad de esta estructura no sólo codifica la información aversiva del ambiente, sino que también es necesaria y suficiente para que los animales expresen repuestas defensivas ante las amenazas señalizadas.

Antecedentes

Lo descrito anteriormente está basado en estudios donde la respuesta defensiva ante una amenaza se expresa de manera pasiva, es decir, no requiere de la ejecución de una acción por parte del animal para ser observada. Sin embargo, la corteza PL también se ha visto involucrada en la expresión de respuestas activas de defensa desencadenadas para evitar o escapar de los estímulos aversivos (Diehl, Bravo-Rivera, and Quirk 2019). Para estudiar experimentalmente este tipo de respuestas, en los laboratorios se entrena a los animales a ejecutar acciones específicas (p.ej., desplazarse a un compartimento seguro, presionar una palanca o subir a una plataforma) durante la presentación de un tono que predice la ocurrencia de la descarga eléctrica. De este modo, el tono sirve como una señal de alerta para que el animal evite estímulos aversivos-dolorosos.

En un estudio donde las ratas debían subirse a una plataforma para evitar una descarga eléctrica señalizada por la presencia de un tono se encontró una correlación positiva entre la actividad neuronal de la corteza PL y la respuesta persistente de los animales para subirse a la plataforma. Esto es, a mayor actividad de la corteza PL mayor fue la respuesta de evitación (Bravo-Rivera *et al.* 2015). En este sentido, la infusión local de muscimol, un agonista GABAérgico que inhibe la actividad excitatoria al promover la hiperpolarización de las neuronas postsinápticas, en la corteza PL disminuyó la respuesta de evitación de los animales para subirse a la plataforma en comparación con el grupo control (Bravo-Rivera *et al.*, 2014). Por lo que, esta estructura también regula la correcta expresión de respuestas activas de defensa ante estímulos amenazantes.

Así mismo, una característica funcional que se ha observado en la corteza PL es que la actividad de esta estructura no es reclutada (Albrechet-Souza, Borelli, and Brandão 2008) ni es necesaria para responder ante la presencia de estímulos que de manera natural representan una amenaza en los animales (Corcoran and Quirk 2007). Por lo que, la corteza PL podría regular la conducta motivada bajo condiciones de conflicto donde compiten estímulos que fueron adquiridos como amenazantes.

Antecedentes

Es importante mencionar que para regular adecuadamente la conducta ante la presencia de amenazas se requiere de la correcta comunicación de la corteza PL con otras estructuras. Por ejemplo, en un estudio se registró la actividad de la corteza PL al mismo tiempo que se administró muscimol en la amígdala o el HV en ratas entrenadas en el condicionamiento al miedo. Se observó que la inactivación de la amígdala decrementó la actividad de neuronas piramidales de la corteza PL y la respuesta de inmovilización de los animales durante la presentación de un tono aversivo. Mientras que, la inactivación del HV decrementó la actividad de las neuronas inhibitorias de la corteza PL e incrementó la respuesta de inmovilización durante el tono (Sotres-Bayon *et al.* 2012). De modo que, la corteza PL regula la expresión de respuestas aversivas a través de su correcta comunicación con diferentes circuitos cerebrales.

Por último, una característica funcional que tiene la corteza PL es que no sólo responde ante la presencia de estímulos negativos que amenazan la seguridad de los animales. La corteza PL también tiene la particularidad de responder ante estímulos de valencia motivacional positiva para dirigir la conducta hacia la búsqueda de recompensas como se verá a continuación.

2.1.3 La corteza Prelímbica codifica estímulos que predicen recompensas y regula la conducta apetitiva

El sistema cerebral apetitivo que nos permite acercarnos a las recompensas se ha estudiado bastante y actualmente se conocen bien las estructuras cerebrales que forman parte de él (Cardinal, Parkinson, Hall, *et al.* 2002). Una de estas estructuras necesarias para la búsqueda de recompensas es la CPFm (Moorman *et al.*, 2015; Peters *et al.*, 2009). Mediante registros electrofisiológicos se han identificado neuronas de la CPFm que modulan su actividad de acuerdo con la presentación de estímulos que predicen una recompensa, pero no así ante estímulos que no predicen recompensas (Pratt and Mizumori 2001). Esto sugiere que la CPFm también codifica la información apetitiva del ambiente.

Antecedentes

Más adelante, se reportó que existe una diferenciación especial entre la corteza PL e IL para procesar conductas apetitivas. Burgos-Robles y colaboradores (2013), implantaron electrodos en la corteza PL o IL de animales que fueron entrenados a presionar una palanca para recibir comida como recompensa. De manera interesante, observaron que la actividad de la corteza PL incrementó rápida y transitoriamente justo en el momento en que los animales presionaron la palanca asociada con la comida. Mientras que, la actividad de la corteza IL aumentó de manera prolongada después de que los animales presionaron la palanca. En ambas estructuras no se observaron cambios en la actividad neuronal cuando las ratas presionaron una palanca que nunca fue asociada con la comida, sugiriendo que las neuronas respondieron específicamente a la recompensa y no a la acción de presionar la palanca (Burgos-Robles, Bravo-Rivera, and Quirk 2013) (**Figura 3**). La evidencia anterior sugiere que la corteza PL responde más ante la presencia de estímulos apetitivos para ejecutar la búsqueda de recompensas, en tanto que la corteza IL se activa preferencialmente durante la acción consumatoria de éstas.

En congruencia con lo descrito, otros estudios han reportado que la corteza PL es necesaria para la búsqueda de recompensas mientras que la corteza IL participa en la supresión de conductas relacionadas con la búsqueda de recompensas (Moorman and Aston-Jones 2015). Por ejemplo, en un estudio donde se entrenó a un grupo de ratas a asociar un tono con la entrega de comida se observó una disminución de la conducta de aproximación al tono cuando los animales recibieron un fármaco que bloqueo la actividad excitatoria de la corteza PL (Sangha et al. 2014). Por otra parte, un estudio reportó que la inhibición de la actividad de la corteza IL mejoró la búsqueda de recompensas a pesar de que los animales ya habían aprendido que una señal ya no predecía su disponibilidad (Rhodes and Killcross 2007). De modo que, en condiciones normales la corteza PL, pero no la IL, impulsa la búsqueda de recompensas.

Antecedentes

La participación de la corteza PL en la búsqueda de recompensas naturales como la comida también se ha observado en la conducta de búsqueda de drogas. Concretamente, en animales que fueron entrenados a suprimir la respuesta de palanqueo para conseguir una droga se observó que la inactivación de la corteza PL impidió la reinstalación de la búsqueda de heroína (Moorman and Aston-Jones 2015). En contraparte, la estimulación de esta corteza incrementó la respuesta de palanqueo de los animales para conseguir cocaína (Peters, Kalivas, and Quirk 2009). De este modo, la actividad de la corteza PL es necesaria y suficiente para impulsar la búsqueda de recompensas tanto naturales como artificiales.

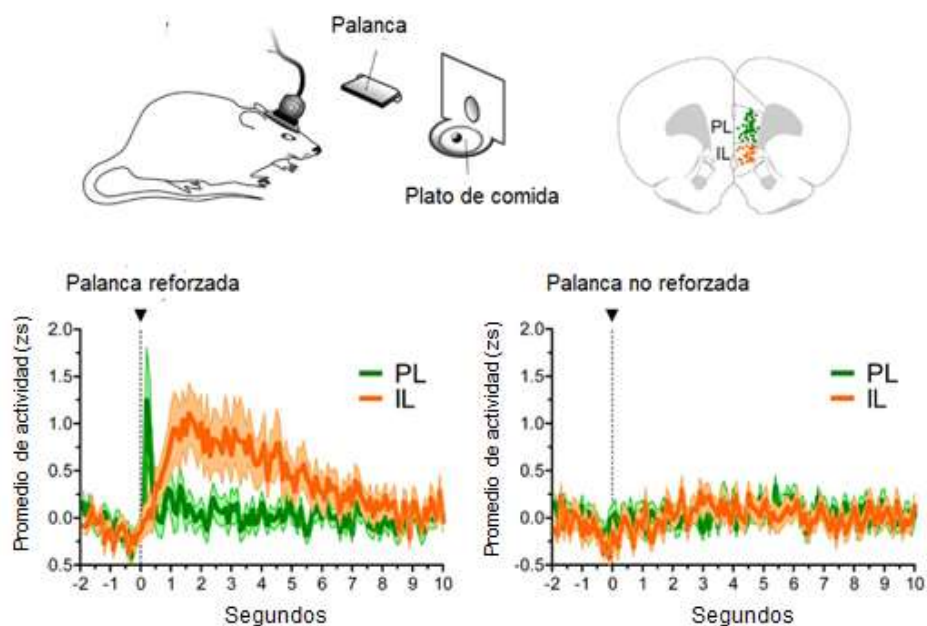


Figura 3. La CPFm codifica de manera diferencial información de estímulos asociados con la entrega de recompensas. Se muestra un incremento en la corteza PL al momento en que las ratas presionaron una palanca para recibir comida como recompensa. Mientras que, la corteza IL responde después de que los animales recibieron la recompensa. La actividad de ambas cortezas no incrementó cuando los animales presionaron una palanca que no fue asociada a la recompensa (Modificado de Burgos-Robles *et al.*, 2013).

Otra propiedad de la corteza PL es que esta estructura no es necesaria para responder ante estímulos naturalmente apetitivos. Por ejemplo, un estudio evaluó la actividad neuronal en la corteza PL después de la presentación de un estímulo neutro (p ej. agua) en comparación

con un estímulo naturalmente apetitivo (p. ej. sacarina). No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de C-fos en la corteza PL después de la presentación de ambos estímulos (De la Cruz, Coke, and Bodnar 2016), sugiriendo que la PL procesa información apetitiva de tipo aprendida. En este sentido, es probable que esta estructura participe en la búsqueda de recompensas bajo condiciones de conflicto que requieren del aprendizaje.

Por último, es necesario mencionar que la búsqueda de recompensas regulada por la corteza PL requiere de su correcta comunicación con diferentes estructuras subcorticales que también procesan información apetitiva del ambiente como el NAcc (Pastor and Medina 2021). A continuación, se describirá la participación del NAcc tanto en el procesamiento de información apetitiva y aversiva.

2.2 Núcleo Accumbens

2.2.1 Anatomía y conectividad

El NAcc es una estructura ubicada en la parte rostro basal del cerebro medio y forma la mayor parte del estriado ventral (región perteneciente a los ganglios basales), junto con el tubérculo olfatorio, la porción ventromedial del núcleo caudado y el putamen (Lopez-Antunez 1979). Como el resto del estriado (dorsal), las neuronas principales del NAcc son las neuronas espinosas medianas de tipo GABAérgicas que constituyen el ~95% de esta estructura. Estas neuronas se clasifican en dos poblaciones distintas: las que expresan receptores de dopamina tipo 1 (NEM-D1) y las que expresan receptores de dopamina tipo 2 (NEM-D2) (Klawonn and Malenka 2018). De manera general, se ha descrito que las NEM-D1 proyectan de manera directa hacia el ATV, en tanto que las NEM-D2 proyectan principalmente hacia el Pálido Ventral (VP) (Nicola 2007).

Morfológicamente, el NAcc se ha dividido en dos regiones principales: el NAcc *Core*, que rodea la comisura anterior (Ca) y el NAcc *Shell* (Zahm, 2000). La distinción entre NAcc

Core y *Shell* se debe, en parte, a la conectividad diferenciada de ambas subregiones. A grandes rasgos, se ha descrito que el NAcc *Shell* se conecta mayoritariamente con los sistemas efectores viscerales y autónomos, mientras que la parte *Core* del NAcc proyecta más con los sistemas motores (Zahm & Heimer, 1993).

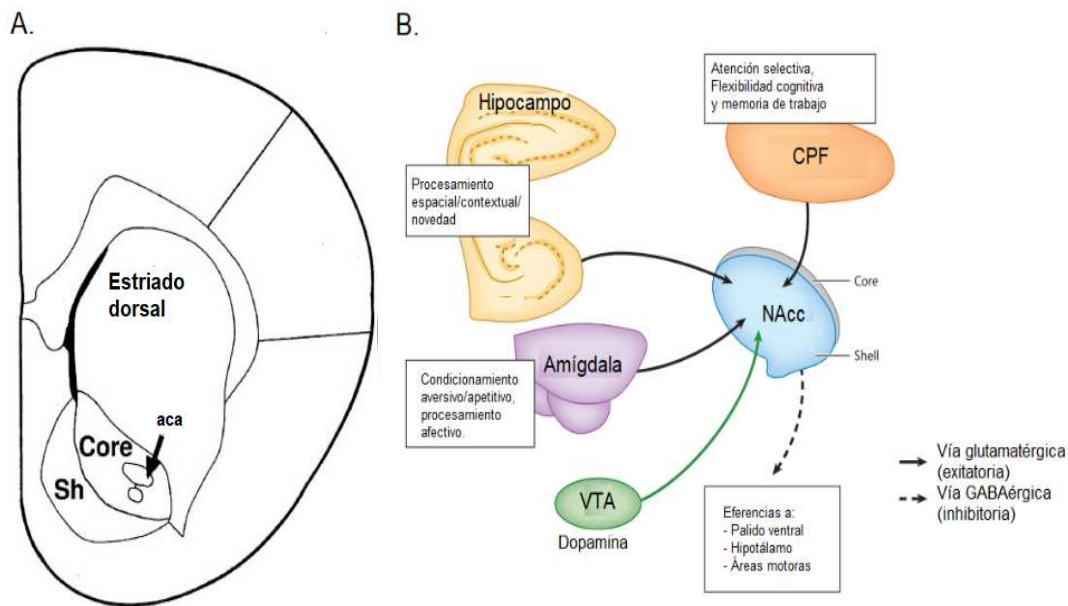


Figura 4. Subdivisión morfológica del NAcc y sus principales aferencias y eferencias. A, El NAcc se divide en NAcc *Core* y NAcc *Shell*. B, El NAcc como una interfaz límbico-motor. El NAcc recibe proyección glutamatergica de la CPF que está relacionada con la flexibilidad cognitiva, del Hipocampo que procesa información espacial y contextual, de la Amígdala que participa en el condicionamiento aversivo y apetitivo y del ATV que es la principal fuente de dopamina en el cerebro. A su vez, el NAcc envía proyecciones GABAérgicas hacia estructuras relacionadas con la motricidad (Modificado de Floresco, 2015).

Por su parte, el NAcc recibe proyecciones glutamatergicas de estructuras límbicas relacionadas con la valencia de los estímulos como la amígdala, así como de estructuras que procesan información espacial y contextual como el hipocampo y de la CPF que está implicada en el razonamiento y la cognición (Floresco 2015). Para este trabajo, es importante mencionar que la corteza PL envía aferencias glutamatergicas de manera preferencial al NAcc *Core*, mientras que la corteza IL proyecta más hacia el NAcc *Shell* (Vertes 2004). Por último, el NAcc recibe también bastas aferencias dopaminérgicas provenientes del ATV y aferencias

noradrenérgicas del Núcleo del Tracto Solitario y del Locus Coeruleus (Zahm, 2000). El NAcc envía diversas proyecciones eferentes principalmente GABAérgicas hacia diferentes núcleos motores como el PV, el ATV y la *substancia nigra pars reticulada* (Zahm, 2000). Por su conectividad anatómica, el NAcc ha sido definido como una interfaz límbica-motor por la extensa comunicación neuroanatómica que recibe y proyecta de diferentes estructuras corticales y subcorticales límbica-motoras (**Figura 4**).

2.2.2 El Núcleo Accumbens codifica estímulos que indican amenaza y regula la conducta de aversión

Durante mucho tiempo se pensó que el NAcc, al formar parte del sistema mesolímbico-dopaminérgico (Parkinson, Cardinal, and Everitt 2000), sólo procesaba información de tipo apetitiva. Sin embargo, se ha demostrado que esta estructura también codifica información negativa de los estímulos ambientales. Por ejemplo, en un estudio se entrenó a ratas a asociar un tono con la entrega intraoral de quinina (un sabor naturalmente aversivo por ser amargo) mientras se registraba la actividad neuronal del NAcc. Después de varios ensayos, se observó que las neuronas registradas en esta estructura incrementaron su tasa de disparo durante la presentación del tono en ausencia de la quinina en comparación con su actividad basal (Setlow, Schoenbaum, and Gallagher 2003). De igual modo, otro estudio reportó que las neuronas del NAcc incrementaron su tasa de disparo durante la presentación intraoral de quinina en comparación con su actividad basal (Roitman, Wheeler, and Carelli 2005). De acuerdo con esta evidencia, otros autores han sugerido que las neuronas del NAcc son capaces de modular su actividad eléctrica antes y después de la presentación de quinina (Han and Lu 2016). En conjunto, esta evidencia electrofisiológica sugiere que el NAcc codifica información del ambiente, tanto aprendida como innata, de estímulos que generan respuestas aversivas (**Figura 5, A y B**).

Consistente con lo anterior, se ha observado que la actividad del NAcc también es necesaria para que los animales expresen reacciones activas de defensa ante estímulos que

Antecedentes

predicen amenazas. Diversos autores han reportado que la administración de fármacos que bloquean la actividad del NAcc *Core* o *Shell* impide que los animales ejecuten respuestas de evitación ante la presencia de señales que predicen la entrega de una descarga eléctrica (Bravo-Rivera *et al.*, 2014; Fernando *et al.*, 2014; Ramirez *et al.*, 2015). De modo que el NAcc, al igual que la corteza PL, es necesario para que los animales expresen respuestas defensivas ante las amenazas señalizadas.

De manera interesante, algunos estudios han observado que existe una diferenciación funcional del NAcc, tanto en *Core* como *Shell*, de acuerdo con su eje anteroposterior. En un estudio realizado por Reynolds y Berridge (2001) administraron un agonista GABAérgico (muscimol) en la parte anterior y posterior del NAcc *Shell* y evaluaron la expresión de respuestas defensivas innatas ante la presencia de un estímulo amenazante. Estos autores observaron que después de la inactivación del NAcc posterior (pNAcc) se observó una mayor expresión de las respuestas defensivas de los animales en comparación con la inactivación del NAcc anterior (aNAcc) y el grupo control (ratas sin el aNAcc y pNAcc inactivado) (Reynolds and Berridge 2001).

En sentido con lo anterior, otro estudio reportó que la administración de muscimol en el pNAcc (especialmente en la región *Core*) incrementó la respuesta de evitación de los animales para entrar al brazo de un laberinto asociado con una descarga eléctrica (Hamel *et al.* 2018). Experimentos realizados en el laboratorio han encontrado que el bloqueo temporal de la actividad del pNAcc mejoró la conducta de evitación de un estímulo gustativo previamente asociado con un malestar gástrico, mientras que la inactivación del aNAcc decrementó la evitación del estímulo gustativo aversivo (Penas-Rincon, *et al.*, 2018). Es decir, en condiciones normales en aNAcc es necesario para evitar la elección de estímulos gustativos aversivos, en tanto que el pNAcc promueve la elección de estímulos gustativos aversivos. En conjunto, estos datos sugieren que de acuerdo con el eje anteroposterior del NAcc la actividad de esta estructura es necesaria para expresar o suprimir respuestas defensivas ante estímulos adquiridos como aversivos.

Antecedentes

Para resumir, el NAcc codifica información de estímulos que de manera natural o aprendida generan respuestas aversivas en los animales. La actividad de esta estructura es necesaria para que los animales expresen respuestas activas de defensa ante la presencia de estímulos que amenazan su seguridad. Por último, existe una diferenciación tanto del NAcc *Core* como del NAcc *Shell* en la expresión de respuestas de evitación ante señales de amenaza. En consecuencia, esta estructura cerebral podría ser necesaria al enfrentar amenazas tanto innatas como aprendidas durante un conflicto motivacional.

2.2.3 El Núcleo Accumbens codifica estímulos que indican recompensas y regula la conducta apetitiva

A diferencia del sistema motivacional aversivo, el sistema apetitivo que permite buscar recompensas se ha relacionado más con el NAcc, particularmente por su comunicación con el sistema dopaminérgico de cerebro (Fields *et al.* 2007). En efecto, los primeros estudios relacionados con el circuito de recompensas consolidaron al NAcc como un centro del “placer” debido a su relación con la búsqueda de recompensas (Mogenson, Jones, and Yim 1980). Actualmente, dada la complejidad anatómica y de conectividad que tiene el NAcc, no sólo se ha relacionado con la búsqueda de recompensas, sino que además participa en la modulación de otras características de la conducta motivada.

En este sentido, Roitman y colaboradores (2004) entrenaron a ratas a asociar un tono con la presentación intraoral de sacarosa (estímulo naturalmente apetitivo por ser dulce) mientras se registraba la actividad neuronal del NAcc. Después de varios días de entrenamiento, se observó que las neuronas del NAcc incrementaron su actividad eléctrica durante la presentación del tono en ausencia de la sacarina en comparación con su actividad basal (Roitman *et al.* 2004). De igual modo, se ha descrito que el NAcc tiene la capacidad de procesar información de estímulos apetitivos innatos. Un estudio similar reportó que las neuronas del NAcc pueden modular su actividad eléctrica de acuerdo con la ausencia o

Antecedentes

presencia de sacarosa (Setlow *et al.*, 2003). Es decir, las neuronas del NAcc pueden detectar recompensas innatas y señalizadas en el ambiente. (**Figura 5, C y D**).

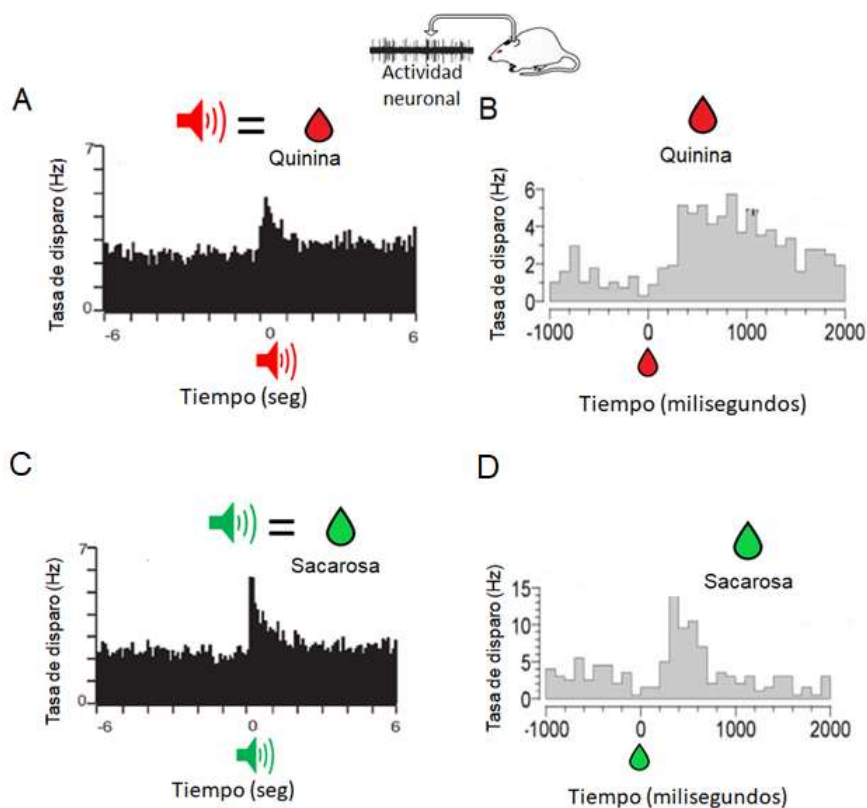


Figura 5. El NAcc codifica información aversiva y apetitiva de estímulos aprendidos e innatos. **A**, Incremento de la actividad neuronal del NAcc durante la presentación de una señal que predice quinina. **B**, Aumento de la actividad neuronal del NAcc durante la presentación intraoral de quinina. **C**, Incremento de la actividad neuronal del NAcc durante la presentación de una señal que predice sacarosa. **D**, Aumento de la actividad neuronal del NAcc durante la presentación intraoral de sacarosa (Setlow *et al.*, 2003; Roitman *et al.*, 2005).

Aunado a lo anterior, se ha observado que una lesión dirigida al NAcc, particularmente al núcleo *Core*, impide la conducta de acercamiento de los animales hacia estímulos que fueron asociados con la entrega de recompensas (*autoshaping*) (Cardinal, *et al.* 2002); sugiriendo que NAcc es necesario para expresar respuestas apetitivas. Sin embargo, cuando se ha evaluado si el NAcc es necesario para que los animales ejecuten respuestas instrumentales para obtener una recompensa la participación de esta estructura no es tan clara. Por ejemplo, se ha

Antecedentes

observado que el bloqueo de la actividad del NAcc impide que los animales presionen una palanca por comida bajo un programa de refuerzo alto (Hamill *et al.* 1999), pero cuando el refuerzo requerido es bajo el bloqueo de la actividad de esta estructura no afecta la respuesta instrumental (Kelley, Smith-Roe, and Holahan 1997). Por lo cual, la participación del NAcc en la búsqueda de recompensas parece depender del tipo de tarea instrumental que se realice.

Otra variable que hace más difícil discernir entre la participación del NAcc en la conducta motivada por recompensas es que se ha encontrado una participación diferencial de esta estructura de acuerdo con su eje anteroposterior. Por ejemplo, Reynolds y Berridge (2001) observaron que la administración de muscimol en el NAcc, especialmente en la parte *Shell*, tuvo efectos opuestos en la ingesta de alimento de acuerdo con la parte anterior o posterior que se evaluó. De manera concisa, la desactivación del aNAcc incrementó la ingesta de alimento, mientras que el pNAcc disminuyó el consumo del mismo (Reynolds and Berridge 2001). Adicionalmente, otro estudio observó que la inactivación del aNAcc *Core* decrementó el tiempo que permanecieron los animales en el brazo de un laberinto asociado a la presencia de sacarina como recompensa (Hamel *et al.* 2017). De modo que, al igual que con la información aversiva, el NAcc contribuye de manera diferencial a la búsqueda de recompensas ante estímulos apetitivos aprendidos e innatos de acuerdo con su eje anteroposterior.

Por último, otra propiedad importante de mencionar del NAcc es que esta estructura también es sensible a la búsqueda de recompensas artificiales como las drogas (Fields *et al.* 2007). Por ejemplo, en un estudio se entrenó a ratas a presionar una palanca para autoadministrarse cocaína ante la presencia y ausencia de una señal que predecía su disponibilidad. Se observó que al inhibir la actividad neuronal del NAcc los animales decrementaron drásticamente su respuesta de palanqueo para recibir la cocaína de manera similar ante la ausencia y presencia de la señal que indicaba su presencia (Stefanik *et al.* 2013). De modo que, el NAcc también es necesario para que los animales ejecuten acciones, aprendidas e innatas, para obtener recompensas artificiales como las drogas.

En resumen, la evidencia acumulada sugiere que el NAcc es una estructura que codifica señales del ambiente que predicen amenazas y recompensas, pero que también procesa información de estímulos que de manera natural son apetitivos y aversivos. En este sentido, se sabe que esta estructura regula las respuestas activas de defensa ante estímulos de amenaza aprendidas e innatas. Aunque ha sido más complicado diferenciar la participación del NAcc en la búsqueda de recompensas hay un consenso en la literatura científica de que esta estructura modula la conducta motivada por estímulos apetitivos de diversa índole como la comida y las drogas. Por lo que, el NAcc podría contribuir a la regulación de la conducta durante condiciones de conflicto guiadas tanto por estímulos aprendidos como innatos.

2.3 Comunicación funcional de la corteza Prelímbica y el Núcleo Accumbens

Como se mencionó anteriormente, la corteza PL y el NAcc no sólo contribuyen a responder adecuadamente ante estímulos opuestos, sino que también existe una comunicación anatómica entre ambas estructuras (Vertes 2004). Gracias al desarrollo de herramientas como la optogenética hoy en día se ha demostrado que la comunicación anatómica entre ambas estructuras es funcional. Estudios recientes han manipulado optogenéticamente los axones aferentes de la corteza PL en el NAcc para evaluar si esta vía es necesaria y/o suficiente para la expresión de conductas motivadas (Stefanik *et al.*, 2016; Friedman *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2018; Diehl *et al.*, 2020).

Para manipular optogenéticamente los axones aferentes de la corteza PL en el NAcc es necesario que las neuronas de la corteza PL expresen opsinas sensibles a luz que al ser estimuladas con una longitud de onda en particular permiten la estimulación o inhibición de la actividad neuronal. Por ejemplo, para fotoinhibir la actividad neuronal se inyecta en las neuronas de proyección un vector viral que permite la expresión de la proteína canal arqueorodopsina (Arch) bajo en promotor de la enzima Calcio Calmodulina Cinasa II (CamKII). Esta proteína canal al ser estimulada con un pulso continuo de luz verde (longitud de onda de

Antecedentes

532 nm) funciona como una bomba de protones al permitir el movimiento de cationes hacia el espacio extracelular. De esta manera, el potencial de membrana en reposo de la neurona se hiperpolariza dando como resultado una menor probabilidad de generar corrientes postsinápticas excitatorias (Boyden 2011). En contra parte, para fotoestimular la actividad neuronal se inyecta en las neuronas de proyección un vector viral que permite la expresión del canal de rodopsina-2 (ChR2), bajo el promotor de CamKII. Este canal al ser estimulado con pulsos pequeños de luz azul (longitud de onda de 473 nm) permiten el paso de cationes hacia el interior de la célula. En consecuencia, el potencial de membrana en reposo se despolariza y resulta en una mayor probabilidad de generar corrientes postsinápticas excitatorias (Deisseroth 2015).

Utilizando los principios de optogenética Stefanik y colaboradores encontraron que la fotoinhibición de los axones de la corteza PL, infectados con el canal de Arch, en el NAcc impide la búsqueda de recompensas. En este estudio, se entrenó a ratas a presionar una palanca para auto administrarse cocaína durante la presentación de una señal que predecía su disponibilidad. Al fotoinhibir la vía PL → NAcc se observó un decremento significativo de la respuesta de palanqueo por la cocaína en comparación con los animales que tuvieron la vía intacta (Stefanik, Kupchik, and Kalivas 2016). De modo que, la correcta comunicación entre la corteza PL y el NAcc es necesaria para buscar recompensas.

Por otra parte, Diehl y colaboradores (2020) publicaron un estudio donde demostraron que la vía PL → NAcc es suficiente para expresar respuestas activas de defensa (evitación) ante la presencia de una señal que predice una amenaza. En este estudio se condicionó a ratas a subirse a una plataforma para evitar la presentación de una descarga eléctrica señalizada por un tono. Al fotoestimular los axones aferentes de la corteza PL en el NAcc durante la presentación del tono aversivo se observó un decremento de la conducta de evitación (Diehl *et al.* 2020). Por lo que, se requiere una correcta comunicación entre la corteza PL y NAcc para que los animales expresen adecuadamente conductas defensivas ante una amenaza (Figura 6).

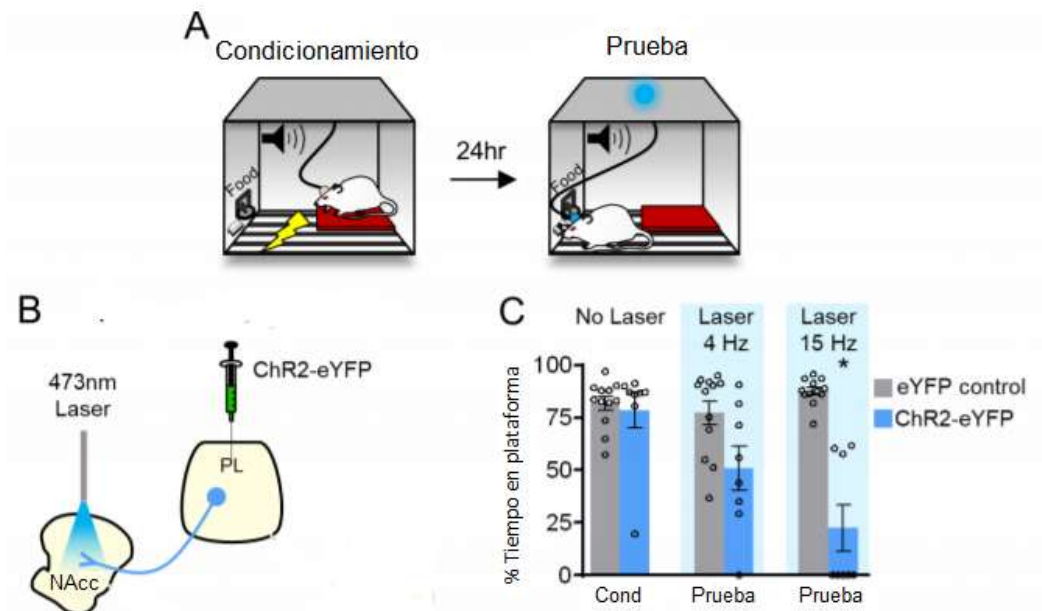


Figura 6. La vía PL→NAcc participa en la expresión de reacciones de defensa ante un estímulo que predice amenaza. **A**, Los animales aprenden a evitar una descarga eléctrica al subirse a una plataforma cuando un tono predice su ocurrencia. **B**, Inyección de un vector viral en la corteza PL para expresar el ChR2 en los axones aferentes de esta estructura en el NAcc. **C**, La fotoactivación de los axones de la corteza PL en el NAcc decrementó la respuesta de evitación ante un tono condicionado como aversivo (Modificado de Diehl *et al.* 2020).

En resumen, la evidencia creciente ha demostrado que: 1) la corteza PL procesa información de estímulos que predicen amenazas y recompensas en el ambiente. La actividad de esta estructura es necesaria y suficiente para expresar respuestas defensivas ante amenazas y respuestas apetitivas ante las recompensas. 2) El NAcc procesa información aprendida e innata de estímulos que indican amenazas y recompensas. Existe una diferenciación anteroposterior de esta estructura para responder ante estímulos de amenaza y de búsqueda de recompensas. 3) Existe una comunicación anatómica y funcional entre la corteza PL y el NAcc para permitir que los animales respondan adecuadamente ante condiciones independientes de amenaza y recompensa. En consecuencia, ambas estructuras podrían regular la conducta de los animales durante condiciones de conflicto en donde es necesario enfrentar amenazas para obtener recompensas.

3. Planteamiento del problema

Alejarse de estímulos amenazantes (aprendidos o innatos) es vital para la supervivencia. Sin embargo, hay ocasiones en donde la presencia de amenazas viene acompañada de recompensas, provocando un conflicto motivacional en los individuos. Bajo esta condición de conflicto, los animales se ven forzados a elegir entre evitar las amenazas bajo el costo de perder recompensas o acercarse a las recompensas bajo el costo de enfrentar amenazas. La conducta de elección bajo conflicto requiere de un mecanismo cerebral eficiente que permita la integración de la información tanto aversiva como positiva del ambiente para permitir la correcta ejecución de respuestas de aproximación o evitación. Poco se sabe de los mecanismos cerebrales que permiten a los animales regular su conducta para confrontar amenazas cuando hay recompensas disponibles durante condiciones de conflicto.

Como se mencionó en los antecedentes de este trabajo, tanto la corteza PL como el NAcc procesan información de estímulos que predicen amenazas y la disponibilidad de recompensas. También, se ha reportado que existe una comunicación anatómica y funcional entre ambas estructuras para permitir que los animales respondan adecuadamente ante estímulos aversivos y apetitivos. Por lo que, nos preguntamos si existe una comunicación funcional entre la corteza PL y el NAcc cuando los animales eligen confrontar amenazas para buscar recompensas.

Para evaluar si existe una comunicación funcional entre la corteza PL y el NAcc durante un conflicto motivacional, primero implementamos tres tareas de conflicto motivacional donde los animales son retados a enfrentar amenazas por recompensas. Utilizamos tanto estímulos aprendidos como innatos para guiar la conducta de los animales durante el conflicto. Antes de evaluar la participación de las estructuras de interés en nuestras tareas de conflicto, validamos farmacológicamente las tres tareas de conflicto mediante la administración sistémica de diazepam. Una vez que validamos que nuestras tareas eran adecuadas para evaluar la conducta de los animales bajo condiciones de conflicto, probamos el efecto de la

Planteamiento del Problema

inactivación temporal de la corteza PL y NAcc, en su eje anterior y posterior, durante las tres tareas de conflicto. Después de que comprobamos que ambas estructuras, de manera independiente, son necesarias para regular la respuesta de los animales ante situaciones de conflicto, evaluamos si la comunicación de la corteza PL y NAcc también participa en la confrontación de una amenaza para obtener una recompensa.

3.1 Pregunta de investigación

¿Cuál es la participación de la vía prefrontal-accumbens en el acto de confrontar una amenaza en la búsqueda de recompensas?

3.2 Hipótesis

La corteza PL, el NAcc y su comunicación son necesarias para regular el acto de confrontar amenazas en búsqueda de recompensas.

3.3 Objetivo general

El propósito de este proyecto fue evaluar si la corteza PL, el NAcc y su comunicación es necesaria para confrontar amenazas en búsqueda de una recompensa ante condiciones de conflicto motivacional. Para lo cual, se desarrollaron los siguientes objetivos particulares:

Objetivo 1: Validar farmacológicamente tres modelos conductuales de conflicto motivacional desarrollados en el laboratorio.

Objetivo 2: Evaluar si la corteza PL es necesaria para enfrentar amenazas en búsqueda de una recompensa durante situaciones de conflicto.

Objetivo 3: Evaluar si el NAcc, anterior y posterior, es necesario para enfrentar amenazas en búsqueda de una recompensa durante situaciones de conflicto.

Objetivo 4: Evaluar si la vía prefrontal-accumbens es necesaria para enfrentar amenazas en búsqueda de una recompensa durante situaciones de conflicto.

4. Método

4.1 Sujetos

Utilizamos ratas macho de la cepa *Wistar* con un peso promedio de 280 gramos al inicio de los experimentos. Los animales fueron colocados en cajas individuales con un ciclo luz/oscuridad de 12 horas. De acuerdo con el protocolo conductual, los animales estuvieron restringidos de alimento (12 gramos al día) o agua (12 mililitros al día) para mantenerlos motivados a buscar recompensas. Para aquellos protocolos conductuales que duraron más de tres semanas con restricción de alimento se añadió a la dieta 5 gramos de comida cada semana para permitir el crecimiento de las ratas. Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de bioética del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.2 Tareas conductuales

El desarrollo de este trabajo requirió de la implementación de tres tareas conductuales de conflicto motivacional donde se retó a ratas a enfrentar amenazas por una recompensa. Aunado a esto, el presente trabajo exigió el uso de otras tareas conductuales que sirvieron como controles para validar que los efectos observados durante las pruebas de conflicto no se debieran a otras variables conductuales como: la motricidad, la ansiedad, la ingesta de alimento o agua, la búsqueda de recompensas o la expresión de reacciones de defensa ante una amenaza. Por tal motivo, en esta sección se enlistan de manera independiente todas las tareas utilizadas a lo largo de este estudio. En la sección de resultados se justificará con detalle el uso de cada una de estas tareas.

Tarea de conflicto mediado por cruces

Las ratas fueron entrenadas en una caja rectangular de acrílico sostenida por una base de acero inoxidable (100 cm largo x 30 cm de ancho x 50 cm de alto) ubicada dentro de un cubículo diseñado para aislarla del ruido exterior (150 cm de largo x 70 cm de ancho x 140 cm

Método

de alto). La caja de entrenamiento consistió en tres zonas: dos zonas “seguras” y una zona de “amenaza” (**Figura 7A**). Cada zona “segura” (20 cm de largo x 30 cm de ancho) se localizó en un extremo opuesto de la caja, mientras que la zona de “amenaza” (60 cm de largo x 30 cm de ancho) se ubicó en medio de la caja. El piso de la zona de “amenaza” está conformada por una serie de barras de acero inoxidable (4.8 mm de diámetro) diseñadas para liberar una descarga eléctrica (Coulbourn Instruments, USA), mientras que el piso de las zonas “seguras” está hecho de acrílico oscuro. Las zonas “seguras” incluyen una bocina y componentes estándar de una caja de condicionamiento operante (un foco de luz, una palanca conectada a un dispensador de pellets de 45 mg y un comedero). La caja estuvo conectada a una computadora personal para ejecutar códigos de MATLAB que controlaron la presentación de estímulos (liberación de comida, luz, bocinas y descarga eléctrica) y registraron los eventos conductuales (presiones de palanca). La parrilla, los pisos y paredes de la caja fueron limpiadas con alcohol al 70% y secadas con toallas de papel entre cada rata. Antes de iniciar el entrenamiento de conflicto, todas las ratas aprendieron a presionar una palanca para obtener pellets de sacarosa (45mg dustless precisión pellets, Bioserve, USA) en un programa de reforzamiento de razón fija uno (RF-1, un pellet por cada palanqueo). Todas las sesiones empezaron y terminaron con 5 minutos de habituación (exposición al contexto en ausencia de estímulos).

Entrenamiento de conflicto

El entrenamiento de conflicto consistió en 5 etapas conductuales: dos etapas de entrenamiento de recompensa (asociación de recompensa y cruces de recompensa), dos etapas de entrenamiento de amenaza (asociación de amenaza y cruces de amenaza) y una etapa de entrenamiento de discriminación para identificar ensayos de conflicto y no conflicto. Todo el entrenamiento de conflicto tuvo una duración de 30 a días consecutivos sin contar fines de semana.

Entrenamiento de recompensa: Las ratas fueron confinadas en una de las zonas “seguras” de la caja, usando un acrílico oscuro como pared, para ser entrenadas a asociar una luz con la disponibilidad de comida (Asociación de recompensa). Un pellet fue entregado en el comedero

Método

cada vez que las ratas presionaron la palanca cuando la luz estuvo encendida (Ensayos de luz), mientras que ningún pellet se entregó cuando la luz estuvo apagada (Ensayos de no luz). Cada ensayo de luz terminó después de que un número determinado de palanqueos, asignados de manera aleatorizada, fueran realizados (en un rango de 5 a 20 palanqueos; un código personal ejecutado en una computadora asociada con el aparato conductual generó este número y asignó el tipo de ensayo a presentar en cada sesión). Por su parte, los ensayos sin luz terminaron después de que transcurrió un tiempo determinado (en un rango de 30 a 180 segundos) generado de manera aleatorizada. Cada sesión de condicionamiento de recompensa tuvo una duración de 30 minutos e involucró ~ 10 ensayos de luz y ~ 10 ensayos sin luz, resultando en un total de ~15 minutos para cada tipo de ensayo. Los animales fueron entrenados una vez al día durante 6 días consecutivos (del día 1 al día 6 del entrenamiento de conflicto).

A continuación, las ratas fueron entrenadas a cruzar de un lado al otro lado opuesto de la caja (zonas “seguras”) para obtener comida señalizada por la luz (Cruces de recompensa). Un ensayo de cruce por recompensa comenzó cuando la luz se encendió en el lado opuesto de la caja en donde la rata se localizaba. El ensayo terminó cuando la luz se apagó después de que la rata cruzó y presionó la palanca o después de que pasaron 180 segundos sin que éstas cruzaran. Para promover la conducta de cruces guiada por la presencia de la luz, en lugar de cruces por hábito o por el azar, las ratas recibieron de uno a tres ensayos de palanqueo reforzados en la misma zona “segura” entre cada ensayo de cruce. Cada sesión de cruces por recompensa estuvo compuesta por 30 ensayos y las ratas fueron entrenadas una vez al día durante 5 días consecutivos (día 7 al día 11 del entrenamiento de conflicto). El entrenamiento de recompensa ocurrió en un total de 11 días (6 días de asociación de recompensa y 5 días de cruces por recompensa). Hasta este momento, las ratas aprendieron a cruzar activamente por la comida guiadas por una luz que predice su disponibilidad (señal de recompensa) en ausencia de conflicto.

Método

Entrenamiento de amenaza: Las ratas fueron confinadas a la zona de “amenaza” (en medio de la caja) usando un par de paredes de acrílico oscuro y un techo de acrílico transparente para ser entrenadas a asociar un ruido blanco (85 dB por 30 segundos) con una descarga eléctrica (0.5 mA por 1 segundo) (Asociación de amenaza). El techo de acrílico estuvo perforado con hoyos de 1.2 cm de diámetro para permitir que el sonido, que viene de las bocinas localizadas en cada lado opuesto de la caja, entrara al área del condicionamiento. Las descargas eléctricas fueron presentadas de manera aleatorizada durante los 30 segundos que se presentó el ruido blanco, así evitamos una asociación temporal entre el ruido blanco y la descarga eléctrica que pudiera limitar las respuestas activas de amenaza en las siguientes fases del entrenamiento (un código personal ejecutado en una computadora asociada al aparato conductual generó un número aleatorizado para entregar las descargas eléctricas). Cinco presentaciones de ruido blanco-descarga eléctrica fueron entregadas cada día con un intervalo inter-estímulo (ITI) de 1 a 3 minutos. Las ratas recibieron una sesión de condicionamiento al día durante cuatro días consecutivos. Al día siguiente, se presentaron dos ruidos blancos en ausencia de la descarga eléctrica para probar la memoria de amenaza señalizada (día 12 al día 16 del entrenamiento de conflicto).

A continuación, las ratas fueron entrenadas a cruzar por la comida (guiadas por la señal de recompensa) al mismo tiempo que se presentó la señal de amenaza (ruido blanco con descarga eléctrica) (cruces de amenaza). Los ensayos de amenaza iniciaron y terminaron del mismo modo que los ensayos de recompensa previamente descritos. La diferencia entre ambos tipos de ensayos fue que en los ensayos de cruces de amenaza las ratas fueron retadas a enfrentar la ocurrencia de una amenaza (0.5 mA de descarga eléctrica señalizada por el ruido blanco) para obtener comida (señalizada por la luz) en una zona “segura” de la caja. Se colocaron dos barreras de acrílico (9 cm de alto) entre la parrilla y cada zona “segura” para evitar que las ratas tocaran la parrilla electrificada antes de cruzar por la comida (los acrílicos se introdujeron desde el entrenamiento de cruces por recompensa para habituar a las ratas a su presencia). La duración de los ensayos de cruces de amenaza fue incrementado a través de

Método

los días para intensificar gradualmente la amenaza en las sesiones de entrenamiento. Los primeros dos días de entrenamiento tuvieron una duración de 30 segundos, el tercer día 60 segundos, el cuarto día 90 segundos y 120 segundos al final del entrenamiento. Cada ensayo terminó después de que transcurriera el tiempo de cruce (30 a 120 segundos), o después de que las ratas exitosamente cruzaron y presionaron la palanca por comida en el lado opuesto de la caja. Los ensayos de cruces de amenaza estuvieron pausados por un ITI de 1 a 3 minutos (igual que en el condicionamiento de amenaza) para evitar que las ratas dejaran de cruzar. Las ratas se entrenaron una vez al día durante 5 días consecutivos (día 17 al día 21 del entrenamiento de conflicto). El entrenamiento de cruces de amenaza transcurrió en un total de 10 días (5 días del entrenamiento de asociación de amenaza y 5 días de cruces de amenaza). Hasta este punto, las ratas habían aprendido a cruzar por comida en condiciones conflicto guiadas por la presencia de la luz que señalizaba recompensa y el ruido blanco acompañado de la descarga eléctrica.

Entrenamiento de discriminación: La última etapa del entrenamiento de conflicto consistió en discriminar entre ensayos de conflicto (cruzar por comida a pesar de la amenaza) y no conflicto (cruzar por la comida en ausencia de amenaza) durante 9 días. Cada sesión de discriminación consistió en un total de 30 ensayos de cruces divididos en 3 bloques de 10 ensayos. Cada bloque de 10 ensayos consistió en 9 o 7 ensayos de no conflicto y en uno o tres ensayos de conflicto (10% o 30% de posibilidad de ocurrencia de la amenaza, respectivamente). Para prevenir que las ratas predijeran el tipo de ensayo, éstos fueron presentados en una secuencia diferente a través de cada bloque de 10 ensayos (un código personalizado ejecutado en una computadora asociada al aparato generó de manera aleatorizada un número para asignar el tipo de ensayo que se presentó considerando el número restringido para cada tipo de ensayos). En ambos tipos de ensayos las ratas tuvieron un tiempo límite (180 segundos) para elegir cruzar o no por la comida. Para incrementar de manera gradual y progresiva el riesgo de los cruces de amenaza, la proporción de ensayos de conflicto y la intensidad de la descarga eléctrica fue incrementada a través de los días. En los primeros tres días de entrenamiento (días 22-24) los

Método

ensayos de conflicto fueron presentados con un porcentaje de ocurrencia del 10% (3 ensayos de conflicto y 27 ensayos de no conflicto) y con una intensidad de la descarga eléctrica de 0.5 mA. Los siguientes tres días (días 25-27) con un 30% de ocurrencia (9 ensayos de conflicto y 21 ensayos de no conflicto) y la misma intensidad de la descarga eléctrica que en días anteriores (0.5 mA). Finalmente, los últimos tres días (días 28-30) se presentó el mismo porcentaje de ocurrencia de la amenaza que en sesiones anteriores, pero con un incremento de la descarga de 0.1 mA por cada día hasta alcanzar una intensidad de 0.8 mA al final del entrenamiento. Hasta este punto, las ratas habían aprendido a discriminar entre ensayos de conflicto y no conflicto. Las ratas que no aprendieron a discriminar entre ambos tipos de ensayos en el último día de entrenamiento ($p < 0.05$ en la comparación entre ensayos de conflicto y no conflicto) y que no cruzaron antes de 180 segundos fueron descartadas de este trabajo.

Reentrenamiento: Para los experimentos que así lo requirieron se realizó un reentrenamiento de 4 días consecutivos bajo las mismas condiciones presentadas en los últimos 4 días del entrenamiento de discriminación.

Prueba de conflicto

La prueba de conflicto se realizó un día después del último día de discriminación o reentrenamiento. Las ratas fueron probadas con 10 ensayos de cruces con las mismas condiciones presentadas en el último día del entrenamiento de discriminación (30% de ocurrencia de la amenaza) pero en ausencia de la descarga eléctrica. Los resultados se expresaron comparando el promedio de las latencias de cruces en ensayos de conflicto y no conflicto antes (pre-Prueba) y después (Prueba) de la inyección o infusión. Para la prueba de conflicto con manipulaciones optogenéticas, que se realizó para evaluar la vía PL→NAcc, las ratas recibieron 2 bloques de 10 ensayos de cruces con el 10 % de ocurrencia de la amenaza. Los resultados se presentaron comparando el promedio de las latencias de cruces en ensayos donde se encendió el láser (Bloque 1, láser *on*) y ensayos donde se apagó el láser (Bloque 2, láser *off*).

Tarea de conflicto mediado por descenso

Las ratas fueron entrenadas y probadas en una caja modificada de la tarea de *step-down inhibitory avoidance* (50 cm largo x 25 cm de ancho x 65 cm de alto) localizada en un cubículo diseñado para atenuar los ruidos externos (61.5 cm de largo x 62.5 cm de ancho x 65 cm de alto). La caja consistió en dos zonas: una zona “segura” y una zona de “amenaza” (**Figura 7 B**). El piso de la zona de “amenaza” (30 cm de largo x 25 cm de ancho) consistió en una serie de barras de acero inoxidable (4.8 mm de diámetro) diseñadas para entregar una descarga eléctrica de baja intensidad (Coulbourn Instruments, USA), mientras que el piso de la zona “segura” (20 cm de largo x 23.5 cm de ancho x 6 cm de alto) estuvo conformada por una plataforma elevada cubierta con un acrílico oscuro. Una puerta corrediza de acrílico fue colocada entre la zona “segura” y la zona de “amenaza” para medir de manera precisa el momento en que los animales descendieron de la plataforma “segura”. Comparado con la caja estándar de *step-down inhibitory avoidance* (Izquierdo I, et al., 1997), nuestra caja incluyó un bebedero con 12 ml de agua con sacarina (0.1%) localizado en la pared opuesta a la zona “segura”. Esta modificación representó un fuerte incentivo para motivar a los animales a descender de la plataforma a pesar de la presencia de la descarga eléctrica. Antes de que el entrenamiento iniciara, las ratas fueron habituadas a la caja durante un día (el bebedero se presentó sin sacarina) para después ser privadas de agua durante 12 horas. Todas las sesiones de entrenamiento y prueba iniciaron con las ratas confinadas a la zona segura durante 5 minutos (la puerta corrediza se mantuvo cerrada). La parrilla, el piso y las paredes del aparato fueron limpiados con alcohol al 70% y secadas con toallas de papel entre cada rata.

Entrenamiento de conflicto

Dos variantes de la *tarea de conflicto mediado por descenso* fueron usadas en grupos independientes de ratas. Una tarea involucró entrenamiento de conflicto, mientras que la otra tarea no involucró condiciones de conflicto. La única diferencia entre ambas tareas fue que durante la tarea de conflicto las ratas fueron entrenadas con restricción de agua (sedientas), mientras que las ratas de la tarea de no conflicto tuvieron acceso libre al agua (no sedientas)

Método

durante el entrenamiento. En ambas tareas, el entrenamiento se dividió en dos etapas conductuales: presentación de recompensa y asociación de amenaza.

Durante las sesiones de presentación de recompensa, después de abrir la puerta corrediza, se les permitió a las ratas descender de la plataforma para acercarse al bebedero (localizado en la zona de “amenaza”) y consumir el agua con sacarina (12 ml) durante 10 minutos. Los animales fueron entrenados una vez al día durante 5 días consecutivos (día 1 al 5). De este modo, permitimos que las ratas se familiarizaran con la caja y alcanzaran un consumo estable de la sacarina a través de los días. Los siguientes dos días (día 6 y 7), las ratas fueron entrenadas a asociar el acto de descender de la plataforma con la entrega de una descarga eléctrica (0.5 mA). La descarga eléctrica se mantuvo presente hasta que los animales regresaron a la plataforma segura y fue entregada cada vez que los animales descendieron de la misma. Hasta este momento, dos grupos independientes de ratas fueron entrenadas en dos condiciones: un grupo (motivado a buscar agua) que aprendió a acercarse a la sacarina a pesar de la presencia de una amenaza (grupo conflicto), mientras que el otro grupo (no motivado a buscar agua) aprendió a evitar descender de la plataforma (grupo no conflicto).

Prueba de conflicto

La prueba de conflicto y la prueba sin conflicto se realizaron un día después de que finalizara el entrenamiento. Las ratas fueron probadas en las mismas condiciones que el último día de entrenamiento (conflicto y no conflicto) pero en ausencia de la descarga eléctrica. Los resultados se expresaron comparando el promedio de las latencias de bajada antes (pre-Prueba) y después (Prueba) de la inyección o infusión en el grupo conflicto y no conflicto.

Tarea de conflicto innato mediado por forrajeo

Las ratas fueron probadas en la arena de un campo abierto modificado (90 cm de largo x 90 cm de ancho x 60 cm de alto) con paredes hechas de madera y un piso hecho con un acrílico transparente. La arena se dividió en dos zonas: una zona “segura” (60 cm de largo x 60 cm de ancho) y una zona de “amenaza” (30 cm de largo x 30 cm de ancho) (**Figura 7C**).

Método

Comparada con la arena estándar del campo abierto (Walsh and Cummins 1976) nuestra arena incluye un haz de luz intensa (1500 lux) focalizada sólo en el centro de la arena (zona de “amenaza”), permitiendo que la periferia de la arena permaneciera oscura (zona “segura”). Esta modificación representó y añadió un estímulo naturalmente aversivo al centro del campo abierto, que ya es innatamente aversivo, sin afectar la periferia de la arena. Las paredes de madera y el piso de la arena fueron limpiados con alcohol al 70 % y secados con toallas de papel entre ratas.

Prueba de conflicto

Dos tipos de pruebas de campo abierto fueron usados en grupos independientes de ratas. Una prueba involucró condiciones de conflicto y la otra prueba no. La única diferencia entre ambas pruebas fue que en la de conflicto se colocaron 30 pellets de sacarosa (1.350 g) en el centro del campo abierto (zona de “amenaza”) y 5 pellets en cada esquina de la arena (0.9 g) para motivar a las ratas a forrajear por comida (Britton and Britton 1981). Por su parte, en la prueba de no conflicto la comida se omitió. Para evitar la aversión innata al nuevo sabor (neofobia) de los pellets de sacarosa, las ratas recibieron 20 pellets (1.125 g) en sus cajas hogar durante dos días antes de la prueba. Las ratas fueron colocadas individualmente en la zona “segura”, y en el tiempo que permanecieron en la zona de amenaza fue grabado durante 10 minutos. El tiempo de permanencia en el centro del campo abierto de la arena se utilizó para evaluar la conducta de forrajeo a pesar de la presencia de amenaza. Los resultados se expresaron comparando el promedio del tiempo de permanencia en el centro del campo abierto después de la inyección o infusión en el grupo conflicto y el grupo no conflicto.

Condicionamiento de amenaza

Para evaluar las reacciones de defensa ante una amenaza señalizada sin conflicto, los animales fueron entrenados a asociar un tono con una descarga eléctrica en cajas estándar de condicionamiento al miedo (Coulbourn Instruments ®). La adquisición del condicionamiento (día 1) se realizó presentando 5 tonos (4 Hz, 70 decibeles, 30 segundos) pareados con una

Método

descarga eléctrica (0.7 mA) con un periodo inter-estímulo (ITI) de 60 a 180 segundos. Un día después de la adquisición del condicionamiento se realizó una prueba (día 2) para evaluar la evocación de la memoria de amenaza. Durante la prueba se presentaron 2 tonos (4 Hz, 70 decibeles, 30 s) en ausencia de la descarga eléctrica. Los resultados se expresaron comparando el porcentaje de inmovilización durante la presentación del tono antes y después de la infusión. Para las manipulaciones optogenéticas, los resultados se presentaron comparando el porcentaje de inmovilización durante el primer tono con el láser encendido (B1, láser *on*) y el segundo tono con el láser apagado (B2, láser *off*).

Condicionamiento de recompensa

Para evaluar la búsqueda de recompensas sin conflicto, los animales fueron entrenados a presionar una palanca para obtener comida como recompensa. La entrega de la recompensa se realizó bajo un programa de reforzamiento de razón fija 1 (RF1). Los animales se entrenaron una vez al día durante 4 días consecutivos. Al día siguiente, cuando las ratas mostraron un palanqueo estable por la recompensa, se realizó una prueba de palanqueo (día 5). Los resultados se expresaron comparando el palanqueo por minuto antes y después de la infusión. Para las manipulaciones optogenéticas, los resultados se presentaron comparando el número de palanqueos registrados durante el primer minuto con el láser encendido (B1, láser *on*) y durante el segundo minuto donde el láser se mantuvo apagado (B2, láser *off*).

Condicionamiento de amenaza con palanqueo

Para evaluar la respuesta defensiva ante una amenaza a pesar de la presencia de recompensas, los animales fueron entrenados a asociar un tono con una descarga eléctrica al mismo tiempo que presionaban una palanca por comida en las cajas estándar de condicionamiento al miedo (Coulbourn Instruments ®). Durante los primeros 6 días, los animales fueron entrenados a presionar una palanca por comida en un programa de reforzamiento de Intervalo variable 60 segundos (IV-60). Al día siguiente, mientras los animales presionaban la palanca por comida, se presentaron 5 tonos (4Hz, 75 decibeles, 30 s)

Método

pareados con una descarga eléctrica (0.7 mA, 1 s) con un ITI 60 – 180 segundos. Al día siguiente, se realizó una prueba de evocación de la memoria de amenaza presentando 2 tonos (4Hz, 75 decibeles, 30 s) en ausencia de la descarga eléctrica. Los resultados fueron expresados comparando el promedio del porcentaje de inmovilización durante la presentación del tono antes y después de la infusión.

Campo abierto

Se midió la locomoción y ansiedad en la arena de un campo abierto estándar. Los animales se colocaron individualmente en el centro del campo abierto y se registró su conducta exploratoria durante 10 minutos. El número de entradas en el centro se tomó como una medida de ansiedad, mientras que la distancia recorrida fue evaluada como una medida de locomoción.

Prueba de la viga elevada

Para evaluar la coordinación motora se usó la prueba de la viga elevada (Goldstein & Davis, 1990). La viga consistió en una barra de madera (100 cm de largo x 2 cm de ancho) colocada 80 cm arriba del piso con una inclinación de 15°. Una caja hogar abierta fue colocada al final de la viga para motivar a las ratas a recorrerla. Se registró el tiempo que tardaron las ratas en recorrer la viga y entrar a sus cajas hogar. Las ratas fueron entrenadas por 5 días a recorrer la viga elevada. Inicialmente (día 1 y 2), las ratas se colocaron a una distancia de 50 cm para después (día 3 al 5) ser colocadas a una distancia de 100 cm de sus cajas hogar. Al día siguiente (día 6) las ratas fueron probadas en la viga elevada.

Prueba de ingesta de alimento

La conducta de ingesta de alimento se evaluó en la caja hogar de los animales, privadas de alimento, calculando la cantidad de comida consumida en sus cajas hogar (Britton and Britton 1981; Rex, Stephens, and Fink 1996). El consumo de alimento fue realizado en dos diferentes condiciones: una condición “habitual” en donde las ratas fueron acostumbradas al

Método

alimento antes de la prueba y una condición “espontánea” en donde las ratas ya conocían el alimento y se requirió sólo un día para realizar la prueba. En la condición habitual, durante 5 días las ratas recibieron en sus cajas hogar 30 gramos de pellets durante 30 minutos. A diferencia de la condición espontánea donde las ratas recibieron en sus cajas hogar sólo 5 gramos de pellets durante 2 minutos. En ambas condiciones, se pesó el plato de comida antes y después de ser colocados en las cajas hogar de las ratas para evaluar el consumo.

Prueba de ingesta de sacarina

La conducta de consumo de sacarina fue evaluada en ratas privadas de agua que se les permitió consumir este líquido en sus cajas hogar durante 5 días consecutivos. Cada día, las ratas fueron expuestas a un bebedero de agua familiar con 50 ml de agua con sacarina (0.1%). Para calcular el consumo de sacarina, se pesó el bebedero antes y después de 30 minutos de su presentación.

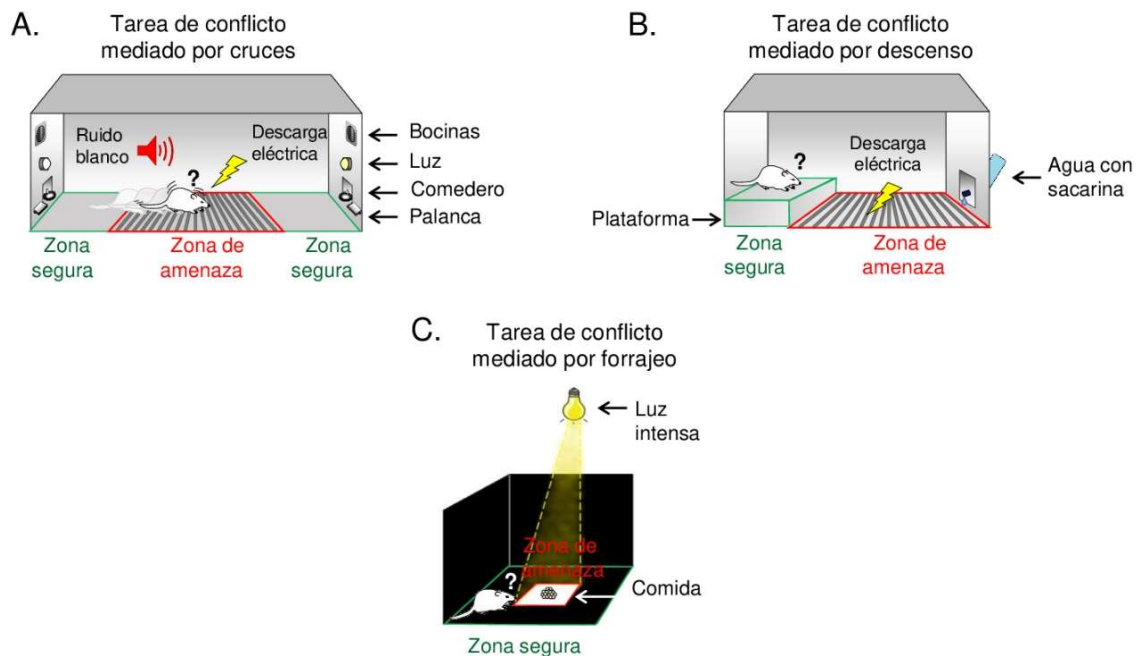


Figura 7. Tareas de conflicto motivacional para estudiar el acto de confrontar amenazas en búsqueda de recompensas. **A**, Durante la tarea de conflicto mediada por cruces, ratas hambrientas son entrenadas a elegir cruzar una parrilla electrificada (zona de amenaza, rojo) para presionar una palanca por comida (pellets, recompensa) en el lado opuesto de una caja rectangular (zona segura, verde), guiadas por señales condicionadas (ruido blanco y luz). **B**, Durante la tarea de conflicto mediada por descenso, ratas sedientas son entrenadas a elegir descender de una plataforma elevada (zona segura, verde) hacia una parrilla electrificada (zona de amenaza, rojo) para acercarse a un bebedero con agua endulzada (sacarina, recompensa). **C**, Durante la tarea de conflicto innato mediado por forrajeo, ratas hambrientas deben abandonar la periferia de un campo abierto (zona segura, verde) para entrar al centro iluminado del campo (zona de amenaza, rojo) y obtener comida (pellets, recompensa).

4.3 Administración sistémica de diazepam

Diazepam (1 o 2 mg/kg de peso) disuelto en una solución estéril (DZMP, 5mg/ml, Valium® , Roche, México) o un volumen equivalente de solución salina (SAL) fueron administrados de manera subcutánea 30 minutos antes de todas las pruebas conductuales.

4.4 Cirugías estereotáxicas

Se utilizó un sistema de anestesia con isoflurano para realizar cirugías estereotáxicas e implantar cánulas bilaterales en la corteza PL (AP, +3.0 mm; ML, ±0.6 mm; DV, -2.4 mm), el aNAcc (AP, +2.5 mm; ML, ±1.6 mm; DV, -5.3 mm) y pNAcc (AP, +1.6 mm; ML, ±2 mm; DV, -6.1 mm). Las cánulas fueron colocadas 1 mm por encima de la estructura de interés y fueron sujetadas con cemento dental y dos tornillos colocados en la base del cráneo para dar soporte al implante. Para los experimentos con manipulaciones optogenéticas se realizó la infusión bilateral de 500 nL (18 nL cada 5 segundos) de dos vectores virales con el constructo rAAV5-CamKII-eArch3.0-eYFP (Vector Core, University of North Caroline, partículas virales 3.4×10^{12}) o AAV5-CamkII-EYFP (Vector Core, University of North Caroline, partículas virales 3.6×10^{12}) mediante la utilización del sistema de inyección Nanoject II (Drummond Scientific). El sistema de inyección se retiró 10 minutos después de cada infusión. En la misma cirugía se implantaron bilateralmente fibras ópticas (200 μ m) previamente pulidas y calibradas en aNAcc (AP, +2.0 mm; ML, ±3.5 mm; DV, -6.4 mm, a partir de dura madre; ángulo de 16°). Las fibras ópticas se implantaron 500 μ m por encima de la estructura para permitir la apertura óptima del cono de iluminación las cuales, fueron sujetadas con cemento dental y dos tornillos

colocados en la base del cráneo para dar soporte al implante. Después de la cirugía, los animales tuvieron 7 días de recuperación con acceso libre a comida y agua para permitir su recuperación.

4.5 Inactivaciones farmacológicas temporales

Antes de las inactivaciones farmacológicas temporales se estimuló la región de interés con agujas dentales que sobresalieron 1 mm por debajo de las cánulas guía para evitar efectos mecánicos de la infusión y habituar a los animales a la manipulación. Para inactivar temporalmente la actividad de las estructuras de interés se utilizó una bomba de infusión en donde se colocaron dos jeringas Hamilton de 10 μL conectadas a dos mangueras con agujas dentales utilizadas como inyectores. Los inyectores se colocaron en las cánulas guía y se infundió un coctel de agonistas gabaérgicos conformado por muscimol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (250 ng/ μL) y baclofeno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (250 ng/ μL). Se infundió un volumen total de 0.5 μL en cada hemisferio a una velocidad de 0.4 μL por minuto. La dosis y el volumen inyectado de los agonistas GABAérgicos se eligieron basados en experimentos pilotos realizados en el laboratorio y estudios previos donde se dirigieron a las mismas estructuras cerebrales (Bravo-Rivera et al. 2014) y tuvieron efectos conductuales sin afectar la locomoción. Los inyectores fueron retirados de las cánulas guía dos minutos después de la infusión de los fármacos. Todas las infusiones se realizaron 15 minutos antes de las pruebas conductuales.

4.6 Parámetros de inhibición optogenética

Para fotoinhibir la vía PL \rightarrow NAcc a través de la activación de la proteína canal Arch se utilizó luz láser a una longitud de onda (λ) de 532 nm de pulso continuo a una potencia de ~ 12 mW. Dependiendo del protocolo conductual el pulso de luz continuo se mantuvo un mínimo de 30 segundos y un máximo de 180 segundos. El pulso de luz fue controlado de manera semiautomática a través de una tarjeta Arduino conectado al láser. Para dirigir la luz láser hacia las fibras ópticas implantadas en los animales se utilizó un cable de fibra óptica (2mm)

Método

conectado directamente al láser (DPSS, 100mw, 532 nm, con un acoplador de fibra multimodo, para una conexión FC/PC, OEM Laser Systems). Este cable se conectó a la entrada de un conmutador rotatorio (Doric Lenses) conectado a un cable dual de fibra óptica colocado en las férulas implantadas en los animales. Previo a cada prueba conductual los animales fueron habituados a realizar las tareas conductuales en presencia del cable de fibra óptica en ausencia de la fotoinhibición durante tres días. Los periodos de fotoinhibición se describen en la sección II de resultados de este trabajo para cada prueba conductual.

4.7 Análisis histológico y adquisición de microfotografías

Se realizó una perfusión intracardiaca con solución salina 0.9% y paraformaldehído (PFA) al 4%. Los cerebros se fijaron con PFA durante 24 horas a una temperatura de 4° C. A continuación, los cerebros se colocaron en sacarosa al 30% y se almacenaron hasta que fueron cortados. Los cerebros se cortaron en rebanadas coronales de 50 μm en un criostato a -20 °C y se montaron los cortes correspondientes a la estructura de interés en laminillas previamente gelatinizadas. Los cortes fueron teñidos con tinción de Nissl para verificar los sitios de microinyección en un microscopio de campo claro (Nikon).

Para los experimentos de optogenética, los cortes de interés se montaron en laminillas *silinizadas* con medio de montaje para fluorescencia (DAKO). Para verificar que la infusión de los constructos virales y la implantación de fibras ópticas quedaron en los sitios de interés se adquirieron microfotografías utilizando un microscopio confocal (Zeiss LSM710). Se utilizó una longitud de onda de 488nm para excitar la proteína amarilla fluorescente y de este modo observar los sitios de infección en la corteza PL y sus proyecciones en el aNAcc. Se adquirió un TILE-scan con el objetivo 10x y 20x de las secciones de interés para verificar el sitio de infección en la corteza PL. Para visualizar los axones en el aNAcc, con el objetivo 60x se adquirieron 15 planos focales con intervalos de 3 μm para cubrir la región de interés. Con el software FIJI/Image J se realizó la máxima proyección en el eje Z con el promedio máximo de intensidad.

4.8 Adquisición y análisis de datos

Todo el comportamiento se registró con cámaras de video digitales (Provisión, modelo D-380D5) ubicadas arriba de cada aparato conductual. Los eventos de presión de palanca y las latencias de cruces fueron adquiridos a través de códigos de MATLAB® (MathWorks Inc.) diseñados para este propósito y fueron ejecutados en una computadora conectada al aparato conductual mediante una interfaz (National Instruments). Los eventos de presión de la palanca (palanqueo por minuto) durante ensayos de luz y no luz fueron expresados en bloques de 10 minutos. Se tomó como latencia de cruce (segundos) el tiempo que tardaron las ratas en cruzar al lado opuesto de la caja y presionar la palanca por comida. Las latencias de cruces se expresaron en bloques de 10 ensayos. Cada sesión de entrenamiento consistió en la presentación de tres bloques de éstos 10 ensayos durante el entrenamiento, mientras que la sesión de prueba consistió en la presentación de un solo bloque de 10 ensayos. La respuesta de inmovilización (%) durante el condicionamiento de amenaza fue expresada en porcentaje de tiempo que los animales pasaron sin ningún movimiento (a excepción de la respiración) durante la exposición al contexto (5 minutos de línea base, LB, antes de la primera presentación del ruido blanco) o 60 segundos después de las presentaciones del ruido blanco. Las latencias de bajada (segundos) se expresaron como el tiempo total que les tomó a las ratas descender de la plataforma, después de que se abrió la puerta corrediza, con sus cuatro patas en la parrilla. Las latencias en la viga elevada se refieren al tiempo total (segundos) que les tomo a las ratas recorrer toda la viga hasta llegar a sus cajas hogar colocadas al final de ésta. El consumo de alimento y de sacarina fue calculado al comparar el peso (gramos) del plato de comida y del bebedero antes y después de ser colocados en las cajas hogar de las ratas. El tiempo de inmovilización, las latencias de bajada, tiempo en la viga, el consumo de alimento y consumo de sacarina fueron registradas de manera manual por un observador entrenado doble ciego. La conducta de exploración en la arena del campo abierto y el tiempo de inmovilización en cajas estándar de condicionamiento al miedo fueron registradas mediante el software Any-maze (Stoelting, EE. UU.). La conducta de exploración en el campo abierto se

Método

expresó como distancia recorrida (centímetros), tiempo de permanencia en el centro (segundos) y número de entradas (eventos) en el centro del campo abierto durante 10 o 5 min. La conducta de inmovilización se expresó en porcentaje de inmovilización durante la presentación del tono (30 segundos). Por último, la supresión de palanqueo se refiere a la ausencia de eventos de palanqueo en un tiempo determinado y se registró mediante el programa Graphic State (Coulbourn instruments). La supresión de palanqueo se calculó al comparar los eventos de presión de la palanca antes y después de la presentación del tono de acuerdo a la siguiente formula: $(\text{pre tono} - \text{tono}) / (\text{pre tono} + \text{tono})$. Un valor cercano a 0 significa poca supresión de palanqueo, por el contrario, un valor cercano a 1 significa una supresión total del palanqueo. De acuerdo con el tipo de datos obtenidos se realizaron pruebas t de Student (muestras dependientes e independientes) para comparaciones simples o análisis de varianzas (ANOVA de una vía y de dos vías entre grupos o entre sujetos) seguido de una prueba post hoc Tukey para comparaciones múltiples según fuera necesario (SATISTICA; StatSoft, EE. UU.).

5.Resultados

Este trabajo se dividió en dos secciones experimentales:

Sección I. Corresponde a la validación farmacológica de tres tareas de conflicto motivacional diseñadas para estudiar en roedores la conducta de enfrentar amenazas en la búsqueda de recompensas. Estas tareas de conflicto se utilizaron para desarrollar la segunda sección experimental de esta tesis. Los antecedentes y discusión de esta sección se encuentran en el artículo: “*Conflict test baterry for studyng the act of facing threats in pursuit to rewards*”.

Sección II. En esta sección se describe la participación de la Corteza Prelímbica, el Núcleo Accumbens y su comunicación en el acto de confrontar amenazas para ir en búsqueda de recompensas. Los resultados de este trabajo se encuentran actualmente en preparación para su publicación.

5.1 Sección experimental I

Resultados

Para probar farmacológicamente la validez de nuestras tareas de conflicto, administramos de manera sistémica diazepam antes de realizar las pruebas de conflicto. De modo que, esta sección experimental se encuentra dividida en tres partes: 1) Descripción de los resultados obtenidos con la administración de diazepam en la *tarea de conflicto mediado por cruces*, 2) Descripción de los resultados obtenidos con la administración de diazepam en la *tarea de conflicto mediado por descenso* y 3) Descripción de los resultados obtenidos con la administración de diazepam en la *tarea de conflicto innato mediado por forrajeo*.

Para validar nuestras tareas de conflicto, primero buscamos una dosis de diazepam que no afectara la conducta motora de los animales. Para esto, evaluamos dos dosis de diazepam en la prueba de campo abierto y la prueba de la viga elevada. Inyectamos a un grupo de ratas con una dosis baja (1mg/kg), una dosis alta (2mg/kg) de diazepam (DZPM) o solución salina (SAL) antes de realizar las pruebas (Material suplementario, Figura 1).

Mediante una ANOVA (seguida de una prueba post hoc, Tukey) encontramos diferencias significativas entre los grupos de diazepam y salina en la locomoción (distancia recorrida, $F_{(2,32)}$: 6.49, $p < 0.01$) y la coordinación motora (Tiempo en la viga elevada, $F_{(2,17)}$: 10.38, $p < 0.01$), pero no en la conducta de ansiedad (Entradas en el centro del campo abierto, $F_{(2,31)}$: 1.05, $p = 0.359$). Encontramos que una dosis baja de diazepam no afectó la distancia recorrida en un campo abierto (SAL: 222.9 cm, DZM: 217.4 cm, $p = 0.98$), el número de entradas en el centro del campo (SAL: 1.94, DZPM: 1.0; $p = 0.44$) o el tiempo que tardaron los animales en recorrer una viga elevada (SAL: 9.6 s, DZPM: 12.8 s, $p = 0.99$) en comparación con el grupo control. En contraste, las ratas inyectadas con una dosis alta de diazepam mostraron un impedimento en la locomoción y coordinación motora sin afectar la conducta de ansiedad, al observar un decremento en la distancia recorrida (SAL: 222.9, DZM: 103.6 cm; $p < 0.001$), un número similar de entradas al centro del campo abierto (SAL: 1.94, DZPM: 1.1; $p = 0.501$) y un incremento en el tiempo requerido para recorrer la viga elevada (SAL: 9.6 s, DZPM: 120.7 s; $p < 0.01$) comparado con el grupo control.

Resultados

Después de observar que la inyección de una dosis alta de diazepam afectó la motricidad de las ratas en comparación con la dosis baja (distancia recorrida, $p < 0.05$; viga elevada, $p < 0.01$), decidimos utilizar la dosis baja de diazepam para probar farmacológicamente la validez de nuestras tareas de conflicto motivacional. A continuación, evaluamos el efecto de esta dosis de diazepam sobre la conducta de elección ante condiciones de conflicto y no conflicto.

5.1.1 El diazepam facilita los cruces de conflicto sin afectar los cruces en ausencia de conflicto

La *tarea de conflicto mediado por cruces* es una versión modificada de una tarea utilizada previamente para mapear sitios cerebrales de autoestimulación. En una serie de experimentos, Olds y Milner (1954) usaron una tarea en donde las ratas debían cruzar una parrilla electrificada para recibir una estimulación eléctrica como recompensa (Olds and Milner 1954). Nuestra tarea involucra comida como recompensa y utiliza el aprendizaje de estímulos discretos para guiar la conducta de elección. Así, nuestra tarea requiere que ratas hambrientas crucen una parrilla electrificada para llegar al otro lado de la caja y presionar una palanca por comida. Además, esta tarea permite el aislamiento de variables clave en un mismo individuo como: 1) el impulso apetitivo indicado por las latencias de aproximación en los ensayos seguros de no conflicto, 2) la respuesta de defensa indicada por la inmovilización en la zona de “amenaza” y 3) la competencia entre el impulso apetitivo y aversivo indicado por las latencias de aproximación en los ensayos de conflicto.

Para evaluar el efecto del diazepam en la conducta de cruces de conflictos las ratas se entrenaron en tres etapas conductuales: entrenamiento de recompensa y de amenaza, seguido de un entrenamiento de discriminación (**Figura 8A**). El entrenamiento de recompensa y amenaza involucró sesiones de entrenamiento asociativo y sesiones de ensayos de cruces. Durante las sesiones de recompensa asociativa (6 días), las ratas son confinadas a uno de los extremos de la caja (zonas “seguras”) donde aprenden que una luz predice la disponibilidad de comida (recompensa) después de presionar una palanca, mientras que la ausencia de luz

Resultados

predice la ausencia de comida. Los animales estabilizaron rápidamente su respuesta de palanqueo por comida durante los ensayos de luz y progresivamente disminuyeron el palanqueo en ensayos sin luz a través de los días de entrenamiento ($F_{(1,26)}$ de grupo = 12.3, $p < 0.001$, F de ensayo $(7,442) = 6.09$, $p < 0.001$; $F_{(7,442)}$ de interacción = 24.0, $p < 0.001$). Nótese cómo los animales cambiaron su preferencia natural de palanqueo en ausencia de luz durante el primer día de entrenamiento (Día 1, primer bloque de ensayos: Luz: 7.58, No luz; 11.63 palanqueos/min, $t_{(13)} = -2.69$, $p = 0.018$) en comparación con el último día (Día 6, primer bloque de ensayos: Luz: 10.12, No luz: 4.49 palanqueos/min, $t_{(13)} = 7.79$, $p < 0.001$). De modo que, en este entrenamiento las ratas asociaron la luz como una señal de recompensa.

Durante los ensayos de cruces de recompensa (5 días) las ratas dejaron de estar restringidas a una zona “segura” de la caja y fueron entrenadas a cruzar de un lado al otro de la caja en busca de alimento guiadas por la señal de recompensa (luz). Observamos un decremento en el tiempo que tardaron los animales en cruzar por la comida (latencias) a través de los días de entrenamiento ($F_{(14,182)} = 16.4$, $p < 0.001$). Como puede observarse en la **figura 8A**, al inicio del entrenamiento los animales mostraron altas latencias de cruces por la comida (Día 7, primer bloque de ensayos: 20.4 s) en comparación con el último día del entrenamiento donde respondieron con cortas latencias de cruces (Día 11, promedio de la sesión: 8.7 s; $t_{(13)} = 6.11$, $p < 0.001$), sugiriendo que los animales aprendieron a cruzar por la comida guiadas por la señal de recompensa.

Una vez que los animales aprendieron a cruzar rápido por la comida guiadas por la señal de recompensa, éstos fueron sometidos a sesiones de entrenamiento de amenaza (5 días). Durante el entrenamiento de amenaza asociativa los animales se encerraron en medio de la caja (zona de “amenaza”) donde fueron condicionados a asociar la presentación de un ruido blanco con la ocurrencia de una descarga eléctrica. Los animales mostraron altos niveles de porcentaje de inmovilización durante el primer día de entrenamiento como lo muestra la **figura 8.A** (Día 12, $t_{(13)} = -5.28$ $p < 0.001$). Consistente con este aprendizaje, los animales respondieron con altos porcentajes de inmovilización ante la presencia del ruido blanco en

Resultados

ausencia de la descarga eléctrica el día de la prueba comparado con los niveles basales antes del condicionamiento (día 16, $t_{(13)} = -5.23$, $p < 0.001$). Entre el inicio del condicionamiento y el día de la prueba las ratas expresaron conductas de escape reflejada por una gran variabilidad en los niveles de inmovilización (días 13 al 15) lo cual, se debe a que la presentación de la descarga eléctrica fue aleatorizada (ver sección de métodos). De este modo, las ratas aprendieron a reaccionar de manera activa en lugar de pasiva ante la presentación de un ruido blanco que señalizó amenaza.

A continuación, los animales fueron entrenados en los cruces de amenazas (5 días). En este entrenamiento los animales aprendieron a cruzar de un lado al otro de la caja por comida a pesar de la presentación del ruido blanco con la parrilla electrificada, como lo indica el incremento en las latencias de cruces a través de los días ($F_{(14,182)} = 142.4$, $p < 0.001$). Gradual y progresivamente, las ratas aprendieron a limitar sus tiempos de cruces de acuerdo al tiempo permitido para cruzar cada día (ver sección de métodos) como lo muestran las cortas latencias de cruces del primer día del entrenamiento (día 17 primer bloque de ensayos: 26.1 s) en comparación con las altas latencias de cruces observadas al final del entrenamiento (día 21 promedio de toda la sesión: 113.3 s; $t_{(13)} = -16.6$, $p < 0.001$).

Hasta este momento, las ratas habían aprendido a cruzar por la comida en condiciones de recompensa y amenaza de manera separada. En la última fase del entrenamiento los animales recibieron sesiones de discriminación (9 días) en donde aprendieron a distinguir, en una misma sesión, entre ensayos de cruces de conflicto (luz y ruido blanco con descarga eléctrica) y ensayos de no conflicto (luz sin ruido blanco). En este entrenamiento las ratas mostraron altas latencias de cruces durante ensayos de conflicto y cortas latencias de cruces durante ensayos de no conflicto a través de los días de entrenamiento ($F_{(1,15)}$ de grupo = 398, $p < 0.001$; $F_{(26,390)}$ de ensayo = 2.72, $p < 0.001$; $F_{(26,390)}$ de interacción = 1.53, $p = 0.047$). Nótese que las ratas empezaron el entrenamiento con latencias de cruces similares entre ambos tipos de ensayos (día 22 promedio de la sesión por ensayo: Conflicto 94.0 s vs No conflicto 78.8 s; $t_{(13)} = -1.66$, $p = 0.119$) y terminaron el entrenamiento (día 30 promedio de la sesión) con

Resultados

altas latencias de cruces durante ensayos de conflicto (81.6) y con cortas latencias durante ensayos de no conflicto (22.7 s; $t_{(13)} = -8.00, p < 0.001$). Esto es, los animales discriminaron exitosamente entre condiciones de conflicto y no conflicto para obtener la comida.

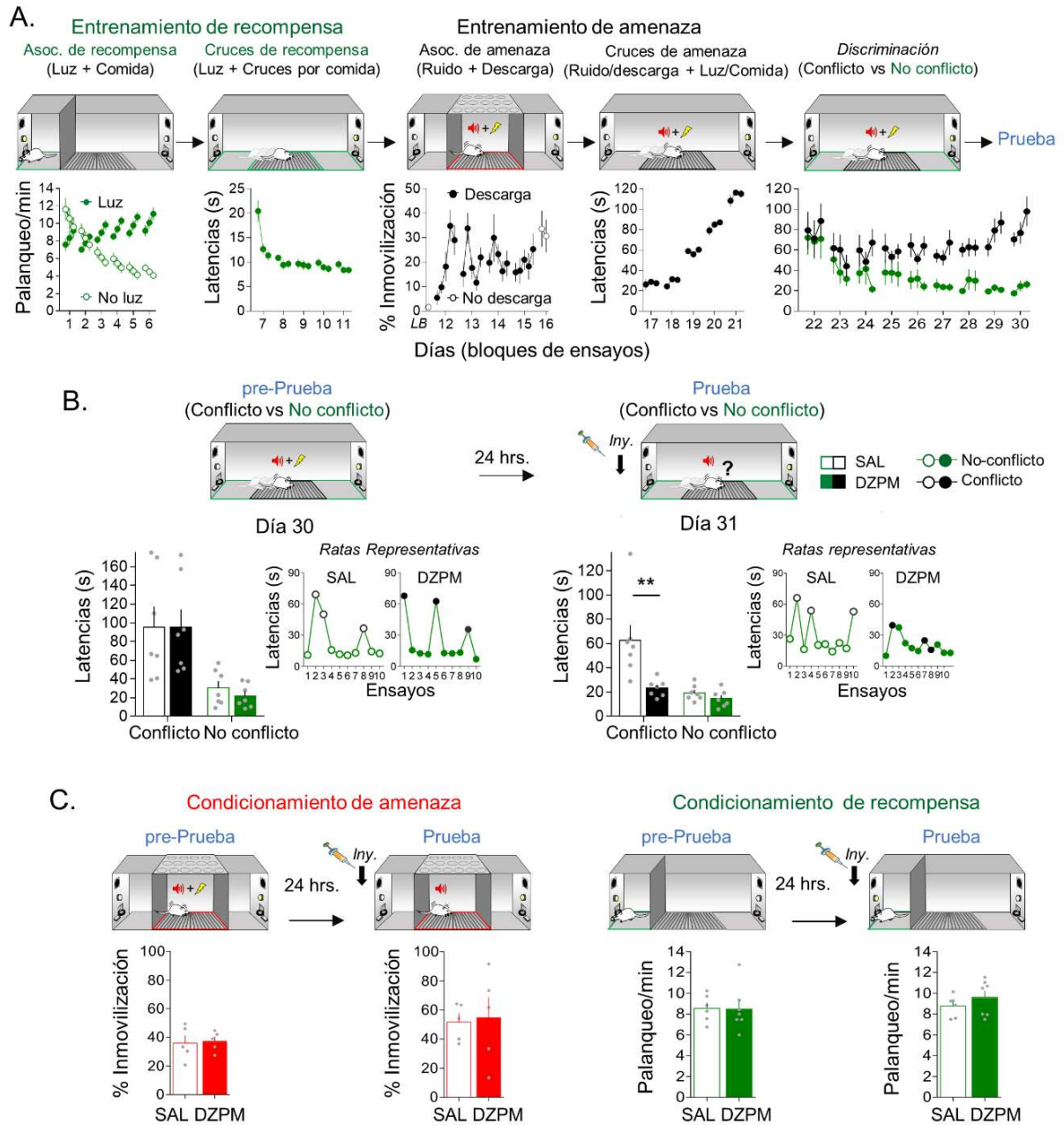


Figura 8. El diazepam decrementa las latencias de cruces durante el conflicto sin afectar los ensayos de no conflicto. A, Las ratas son entrenadas en la tarea de conflicto mediada por cruces durante 30 días (n= 14). Primero, ratas hambrientas, confinadas en la zona segura (verde), aprendieron a presionar una palanca por comida sólo en presencia de una luz (condicionamiento de recompensa), seguido de un entrenamiento de cruces

Resultados

por recompensa en donde cruzan a la zona “segura” opuesta de la caja para obtener comida señalizada por la luz (cruces sin conflicto). Después, las ratas son confinadas en la zona de amenaza (parrilla, rojo) para asociar la ocurrencia de un ruido blanco con una descarga eléctrica (entrenamiento de amenaza), seguido de un entrenamiento de cruces de amenaza donde se presentan de manera simultánea las contingencias aprendidas (luz/comida y ruido blanco/descarga eléctrica). Finalmente, las ratas fueron entrenadas a discriminar entre ensayos de conflicto (luz/comida y ruido/descarga) y no conflicto (luz/comida) para obtener comida. Los datos del palanqueo (por minuto) y latencias de cruces (s) son presentadas en bloques de tres ensayos por día, mientras que, el porcentaje de inmovilización (con y sin descarga eléctrica) es presentado por cada ensayo. Al final del entrenamiento de conflicto, las ratas muestran altas latencias de cruces durante los ensayos de conflicto (negro) comparado con ensayos de no conflicto (verde). **B**, Antes de la inyección (pre-Prueba), el grupo salina y el grupo diazepam (SAL, n= 7; DZPM, n= 7) respondieron de manera similar con altas latencias de cruces durante ensayos de conflicto y con cortas latencias de cruces en ensayos de no conflicto (*Izquierda*: promedio de latencias de cruces de los grupos evaluados; *Derecha*: Desempeño de ratas representativas ensayo por ensayo). Al siguiente día, después de la inyección (Prueba), las ratas tratadas con diazepam decrementaron sus latencias de cruces durante los ensayos de conflicto, sin afectar los ensayos de no conflicto, en comparación con las ratas tratadas con salina (*Izquierda*: promedio de latencias de cruces de los grupos evaluados; *Derecha*: Desempeño de ratas representativas ensayo por ensayo). **C**, Un grupo de ratas fue entrenado de manera independiente en el condicionamiento de amenaza y de recompensa. Antes (pre-Prueba) y después (Prueba) de la inyección, las ratas tratadas con salina y con diazepam mostraron respuestas similares de inmovilización durante el condicionamiento aversivo (SAL, n= 5, DZPM, n= 5) y similar número de palanqueo por minuto durante el condicionamiento apetitivo (SAL, n= 6, DZPM, n= 7). El error en las barras indica el error estándar de la media (ESM). LB, línea base. ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Para evaluar el efecto del diazepam en la prueba de cruces de conflicto las ratas fueron separadas en dos grupos con latencias de cruces similares en ensayos de conflicto y no conflicto (pre-Prueba, $F_{(1,24)}$ de grupo = 0.07, p = 0.787; $F_{(1,24)}$ de ensayos = 20.64, p < 0.001; $F_{(1,24)}$ de interacción = 0.076, p = 0.784) (**Figura 8B**). Al día siguiente (día 31), las ratas fueron probadas con 10 ensayos de cruces, en ausencia de la descarga eléctrica, después de recibir una inyección de SAL o DZPM. Encontramos que las ratas que fueron tratadas con diazepam cruzaron más rápido los ensayos de conflicto (23.3 s) en comparación con las ratas que recibieron salina (62.6 s), sin afectar las latencias de cruces en ensayos de no conflicto (DZPM: 14.7 s, SAL: 19.4 s) ($F_{(1,24)}$ de grupo = 10.6, p < 0.01, $F_{(1,24)}$ de ensayo = 14.75, p < 0.001; $F_{(1,24)}$ de interacción = 6.58; p < 0.05). Nótese que las ratas que fueron tratadas con diazepam cruzaron de manera similar los ensayos de conflicto (23.3 s) y no conflicto (14.7 s) después de la inyección (Prueba post hoc después de ANOVA: p = 0.80).

Posteriormente, probamos si el efecto observado con el diazepam se debió a impedimento en la expresión independiente de la memoria de amenaza y de recompensa. Para

Resultados

esto, inyectamos diazepam o solución salina en grupos independientes de animales antes de una prueba de condicionamiento de amenaza y de recompensa (**Figura 8C**). Grupos independientes de ratas fueron entrenados en el condicionamiento asociativo de amenaza y de recompensa (como se mencionó anteriormente en el entrenamiento de conflicto) y evaluados al día siguiente en una prueba de evocación de la memoria después de la inyección de salina o diazepam. Antes (pre-Prueba) de la inyección ambos grupos de animales mostraron altos niveles de inmovilización y de palanqueo ($t_{(8)} = -0.21$, $p = 0.83$, $t_{(11)} = 0.06$, $p = 0.95$). Después de la inyección (Prueba) encontramos que el diazepam no afectó la expresión de la memoria al observar niveles similares de inmovilización (DZPM: 57.33%, SAL: 51.6 %) y de presiones de palanca (DZPM: 8.7, SAL: 9.6 palanqueos/min) comparado con el grupo control ($t_{(8)} = 0.49$, $p = 0.63$, $t_{(11)} = -1.03$, $p = 0.32$).

Estos resultados sugieren que el diazepam no afecta la respuesta de los animales ante la presencia de estímulos que predicen una amenaza o una recompensa evaluadas de manera independiente, pero sí facilita la conducta de elección ante condiciones de conflicto. En conjunto, estos hallazgos validan nuestra *tarea de conflicto mediada por cruces* al mostrar que el diazepam facilita la habilidad de las ratas para elegir confrontar amenazas aprendidas para ejecutar respuestas apetitivas apropiadas en la búsqueda de recompensas aprendidas.

5.1.2 El diazepam facilita la conducta de descenso durante la prueba de conflicto sin afectar el no conflicto

A menudo, los estímulos innatos guían el acto de enfrentar amenazas para obtener recompensas. Los animales frecuentemente forrajeon por recompensas innatas como el agua y los sabores dulces. Para estudiar la búsqueda de recompensas innatas en competencia con amenazas aprendidas evaluamos la recuperación de una memoria aversiva en dos variantes de la tarea de *step-down inhibitory avoidance*: conflicto (ratas con restricción de agua) y no conflicto (ratas sin restricción de agua). En la tarea estándar de *step-down inhibitory avoidance* los animales rápidamente aprenden a dejar de descender de una plataforma para evitar una parrilla electrificada (Izquierdo *et al.*, 1997). Para estudiar condiciones de conflicto

Resultados

modificamos esta tarea al poner un bebedero con sacarina al final de la parrilla, opuesta a la plataforma segura (ver sección de métodos). Probamos la conducta de descenso mediado por conflicto al comparar las latencias de bajada por la sacarina en dos grupos independientes de ratas. Un grupo de ratas recibió entrenamiento de conflicto y el otro grupo recibió entrenamiento de no conflicto. El entrenamiento de conflicto involucró a ratas con restricción de agua para motivarlas a enfrentar una amenaza por la recompensa. Por su parte, en el entrenamiento de no conflicto las ratas tuvieron acceso libre al agua y por tanto no estuvieron motivadas a acercarse a la recompensa. Ambos grupos de animales recibieron entrenamiento de conflicto y no conflicto que consistió en tres etapas conductuales: presentación de recompensa y asociación de amenaza (**Figura 9A**)

Durante la sección de presentación de recompensa (5 días) los animales decrementaron sus latencias de bajada a través de los días del entrenamiento de conflicto ($F_{(1,64)} = 17.63$; $p < 0.001$) y no conflicto ($F_{(1,44)} = 11.35$; $p < 0.001$). En ambos grupos de animales se observaron altas latencias de bajada en el primer día que se les presentó la sacarina (día 1, entrenamiento de conflicto: 284.4 s, entrenamiento de no conflicto: 463.0 s) y cortas latencias de bajada en el último día (día 5, entrenamiento de conflicto: 15.5 s; entrenamiento de no conflicto: 101.0 s, conflicto: $t_{(16)} = 4.53$, $p < 0.001$; no conflicto: $t_{(11)} = 5.04$, $p < 0.001$). Hasta aquí, ambos grupos de ratas mostraron latencias similares de bajada para obtener la sacarina ($t_{(11)} = -1.73$, $p = 0.094$).

Después de la presentación de recompensa comenzó el entrenamiento de asociación de amenaza (2 días). En este entrenamiento las ratas recibieron una descarga eléctrica en la parrilla (zona de “amenaza”) inmediatamente después de que bajaron de la plataforma (zona “segura”). Rápidamente, las ratas aprendieron a asociar la acción de bajar de la plataforma con la ocurrencia de la descarga eléctrica al incrementar las latencias de bajada en el último día del entrenamiento (día 7, entrenamiento de conflicto : 401.0 s; día 7, entrenamiento de no conflicto: 529.9 s) en comparación con el primer día de entrenamiento en ambos grupos de

Resultados

animales (día 6, entrenamiento de conflicto: 4.1 s, $t_{(16)} = -6.97$, $p < 0.001$; día 6, entrenamiento de no conflicto: 154.0 s; $t_{(11)} = -5.64$, $p < 0.001$).

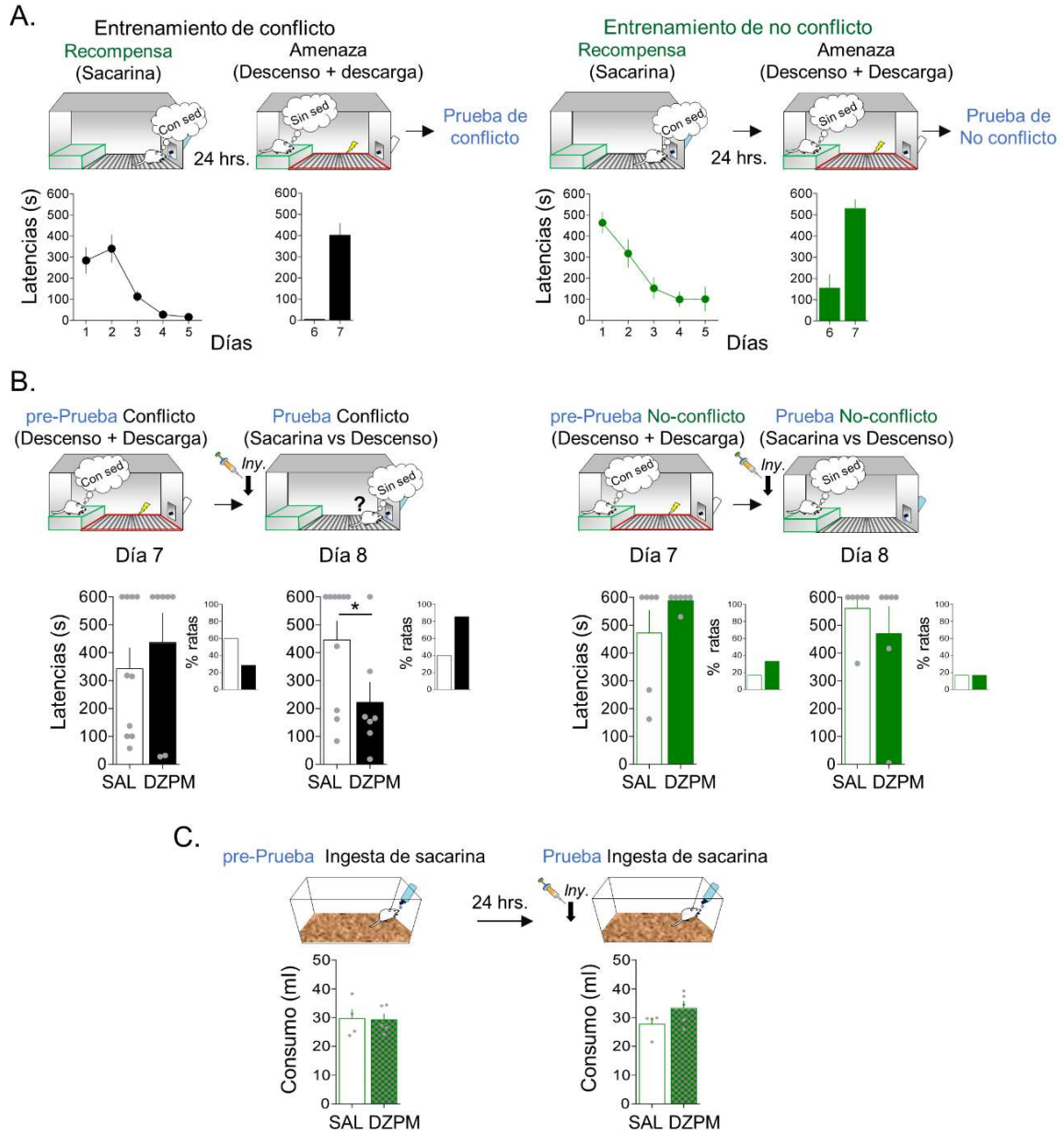


Figura 9. El diazepam decremanta las latencias de descenso durante la prueba de conflicto sin afectar la prueba de no conflicto. *A*, Las ratas adquirieron conducta de descenso mediado por conflicto y no conflicto. *Izquierda*, En la condición de conflicto (negro), las ratas ($n = 17$) innatamente motivadas a beber (con sed) descendieron de la plataforma (zona segura, verde) para obtener agua con sacarina (presentación de recompensa) de un bebedero colocado al final de parrilla, seguido del entrenamiento de amenaza donde asocian el acto de descender de la plataforma con una descarga eléctrica en la parrilla contextual (zona de amenaza, rojo). *Derecha*, En la condición de no conflicto, las ratas ($n = 12$) con acceso libre al agua (sin sed) descendieron de la plataforma

Resultados

para obtener sacarina, seguido de la entrega de la descarga eléctrica después de descender de la plataforma. Las latencias de bajada (4 patas en la parrilla) fueron presentadas en un solo ensayo por día. **B**, Antes de la inyección (pre-Prueba) el grupo salina (SAL) y el grupo diazepam (DZPM), durante condiciones de conflicto (Izquierda, negro) y no conflicto (Derecha, verde), mostraron altas latencias de bajada. Al siguiente día, después de la inyección (Prueba), las ratas tratadas con diazepam decrementaron las latencias de bajada durante condiciones de conflicto ($n=7$) sin afectar condiciones de no conflicto ($n=6$), comparado con las ratas tratadas con salina (SAL, $n=10$, $n=6$, respectivamente). Los *insets* de las gráficas muestran el porcentaje de ratas que exitosamente descendieron de la plataforma para acercarse a la recompensa durante condiciones de conflicto y no conflicto antes y después de la inyección. **C**, Ratas en sus cajas hogar mostraron niveles similares de consumo de sacarina antes (pre-Prueba) y después (Prueba) de la inyección de salina o diazepam (SAL, $n=4$; DZPM, $n=5$). El error en las barras indica ESM * $p < 0.05$.

Para evaluar el efecto del diazepam en la prueba de descenso mediado por conflicto las ratas que recibieron entrenamiento de conflicto y no conflicto fueron separados en dos grupos de ratas con similares latencias de bajada (día 7, pre-Prueba, conflicto, $t_{(15)} = -0.74$, $p = 0.46$; día 7, pre-Prueba, no conflicto: $t_{(10)} = -1.40$, $p = 0.19$; **Figura 9B**). Al día siguiente (día 8), las ratas fueron probadas en ausencia de la descarga eléctrica después de la administración de SAL o DZPM. Observamos que los animales que recibieron DZPM decrementaron las latencias de bajada en comparación con las ratas que fueron inyectadas con SAL (SAL: 446.1 s, DZPM: 225.5 s, $t_{(15)} = 2.2$; $p < 0.05$). En contraste, durante la prueba de no conflicto encontramos que tanto las ratas que fueron inyectadas con DZPM como las ratas que recibieron SAL respondieron con altas latencias de bajada el día de la prueba (SAL: 560.3 s, DZPM: 470.1 s, $t_{(10)} = 0.85$; $p = 0.41$). Consistente con estos datos, también observamos una gran proporción de ratas inyectadas con DZPM (85%) en comparación con las ratas inyectadas con SAL (40%) que se acercaron a la sacarina durante el conflicto. Mientras que, durante la prueba de no conflicto las ratas tratadas con salina o con diazepam bajaron por la sacarina en una proporción similar (SAL: 6%, DZPM: 16%) (**Figura 9B, insets**).

Posteriormente probamos si el decremento observado en las latencias de bajada con la administración de diazepam se debió a un incremento en la búsqueda de sacarina, inyectamos SAL o DZPM a un grupo independiente de ratas antes de que realizar una prueba de consumo libre de sacarina en sus cajas hogar (**Figura 9C**). Antes de la administración de diazepam o salina ambos grupos de ratas mostraron niveles similares de consumo de sacarina (SAL:

Resultados

29.67ml, DZPM: 28.24 ml; $t_{(7)} = 0.34$, $p = 0.74$). Después de la inyección (Prueba), observamos que las ratas inyectadas con diazepam consumieron niveles similares de sacarina que el grupo control (SAL: 27.7 ml, DZPM: 33.3 ml, $t_{(7)} = -1.67$, $p = 0.13$). Estos resultados sugieren que el diazepam decrementó las latencias de bajada durante la prueba de descenso mediada por el conflicto sin afectar la búsqueda de recompensa por sí misma. En conjunto, estos hallazgos validan nuestra *tarea de descenso mediado por conflicto* al observar que la administración de diazepam facilita la conducta de elección de las ratas para enfrentar una amenaza aprendida por la búsqueda de recompensas innatas.

5.1.3 El diazepam facilita la conducta innata de forrajeo durante la prueba de conflicto sin afectar la prueba de no conflicto

En la naturaleza, con frecuencia, los animales deben correr el riesgo de encontrarse con un depredador mientras forrajean por comida. Por ejemplo, los roedores suelen arriesgarse a buscar comida en un campo abierto a pesar de que puedan ser detectados por aves depredadoras. Para evaluar la habilidad que tienen los roedores para enfrentar amenazas innatas para obtener comida, evaluamos la conducta de forrajeo mediada por condiciones de conflicto y no conflicto en una modificación de la tarea de campo abierto. En la tarea estándar de campo abierto las ratas exploran la periferia de un ambiente nuevo (zona “segura”) mientras que naturalmente evitan entrar al centro del campo abierto (Walsh and Cummins 1976).

Para estudiar la expresión de la conducta de elección bajo conflicto, desarrollamos una versión modificada de la prueba de campo abierto añadiendo comida y una luz intensa en el centro de la arena del campo (ver métodos). La conducta innata de forrajeo durante conflicto se evaluó al comparar la conducta de exploración en un campo abierto en dos grupos de animales independientes. Un grupo de ratas fue expuesta a condiciones de conflicto, mientras que el otro grupo fue probado en condiciones de no conflicto. La prueba de conflicto involucró comida en el centro iluminado del campo abierto (**Figura 10A**), mientras que en la prueba de no conflicto la comida fue omitida (**Figura 10B**).

Resultados

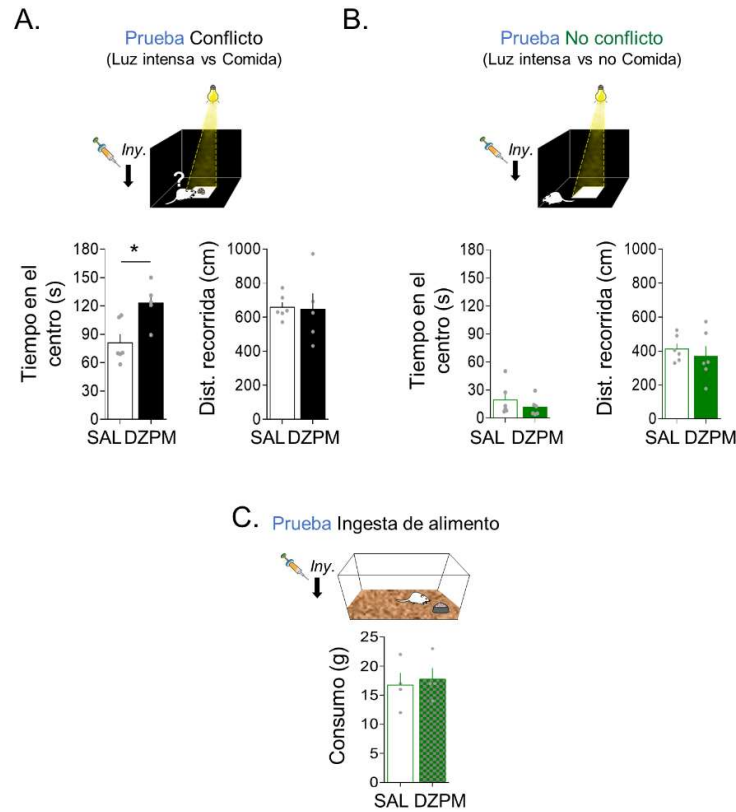


Figura 10. El diazepam incrementa la conducta de forrajeo durante condiciones de conflicto sin afectar el no conflicto. Ratas hambrientas fueron colocadas en la arena de un campo abierto modificado para probar la conducta de forrajeo y locomoción general ante condiciones de conflicto y no conflicto. **A**, En la prueba de conflicto mediado por forrajeo, las ratas tratadas con diazepam permanecieron más tiempo forrajeando por comida (recompensa) en el centro iluminado del campo abierto (zona de amenaza) en comparación con las ratas tratadas con salina (SAL, n= 6; DZPM, n= 5). **B**, En la prueba de forrajeo sin conflicto donde no hay disponibilidad de comida (no recompensa) en el centro del campo abierto (no conflicto), el tiempo en el centro iluminado y la distancia recorrida en el campo abierto fueron similares en el grupo salina y diazepam (SAL, n= 6; DZPM, n= 6). **C**, Ratas en sus cajas hogar mostraron niveles similares de ingesta de alimento después de la inyección de salina o diazepam (SAL, n= 4; DZPM, n= 4). El error en las barras indica ESM * $p < 0.05$.

Evaluamos el efecto de diazepam en la conducta instintiva de forrajeo durante conflicto comparando la conducta exploratoria en un campo abierto de animales probados bajo condiciones de conflicto y no conflicto después de la inyección de salina o diazepam. Encontramos que las ratas que fueron inyectadas con diazepam incrementaron el tiempo que permanecieron en el centro del campo abierto en comparación con las ratas que recibieron salina en la prueba de conflicto (SAL:81.03 s, DZPM: 123.1 s, $t_{(9)} = -3.1, p < 0.011$). El efecto del

Resultados

diazepam en la prueba de conflicto fue independiente de la conducta motora. Después de la inyección, las ratas tratadas con salina y con diazepam recorrieron el campo abierto de manera similar (distancia recorrida, cm) durante la prueba de conflicto (SAL: 658.73 cm, DZPM: 648.05 cm; $t_{(9)} = 0.11, p < 0.908$).

En contraste, la administración de diazepam no afectó la conducta de forrajeo ni la motricidad durante la prueba de no conflicto. Después de la inyección, las ratas que recibieron salina o diazepam respondieron con tiempos de permanencia similares en el centro del campo abierto sin comida (SAL: 19.3 s, DZPM: 11.7 s; $t_{(10)} = 0.96, p = 0.35$) y recorrieron de manera similar el campo abierto (SAL: 412.87 cm, DZPM: 369.35 cm; $t_{(10)} = 0.64, p = 0.53$). El efecto de diazepam observado en el conflicto no se debió a un incremento en la ingesta de comida ya que ambos grupos de animales consumieron la misma cantidad de comida durante la prueba de conflicto (SAL: 2.25 g, DZPM: 2.20 g; $t_{(9)} = 1.10, p = 0.531$).

Adicionalmente, evaluamos si la administración de diazepam produjo hiperfagia en los animales (Johnson 1978). En un grupo independiente de ratas inyectamos salina o diazepam antes de una prueba de ingesta de alimento en sus cajas hogar (**Figura 10C**). Encontramos que el diazepam no incrementó el consumo de alimento, tanto los animales inyectados con salina como con diazepam consumieron comida de manera similar (día 5, SAL: 16.7 g, DZPM: 17.7 g; $t_{(6)} = -0.35, p = 0.73$). Consistente con lo anterior, cuando comparamos la cantidad de comida ingerida por las ratas de manera individual antes (día 4, libre de droga) y después de la manipulación farmacológica (día 5) corroboramos que el diazepam no incrementó el consumo de alimento durante la prueba (día 4 sin droga: 15.0 g, día 5 con droga: 17.7 g, $t_{(3)} = -1.06, p = 0.36$). Estos resultados indican que el diazepam incrementó la conducta de forrajeo de los animales durante el conflicto sin afectar el no conflicto o la ingesta de alimento. En conjunto, estos hallazgos validan nuestra *tarea de conflicto innato mediado por forrajeo* al observar que el diazepam facilita la habilidad de las ratas para elegir confrontar amenazas innatas durante el forrajeo.

5.2 Sección experimental II

Resultados

Después validar nuestras tareas de conflicto mediante la administración de diazepam, decidimos probar en grupos independientes de ratas si la corteza PL y el NAcc, en su región anterior y posterior, son necesarios para que los animales enfrenten amenazas para buscar recompensas. Por lo que, la descripción de los resultados de esta sección experimental está dividida en cuatro partes: 1) resultados de la desactivación de la corteza PL en tareas de conflicto motivacional; 2) resultados de la desactivación del aNAcc en las tareas de conflicto motivacional; 3) resultados de la desactivación del pNAcc en tareas de conflicto motivacional; y 4) resultados de la inhibición optogenética de los axones aferentes de la corteza PL en el NAcc (vía PL→NAcc) durante la *tarea de conflicto mediado por cruces*.

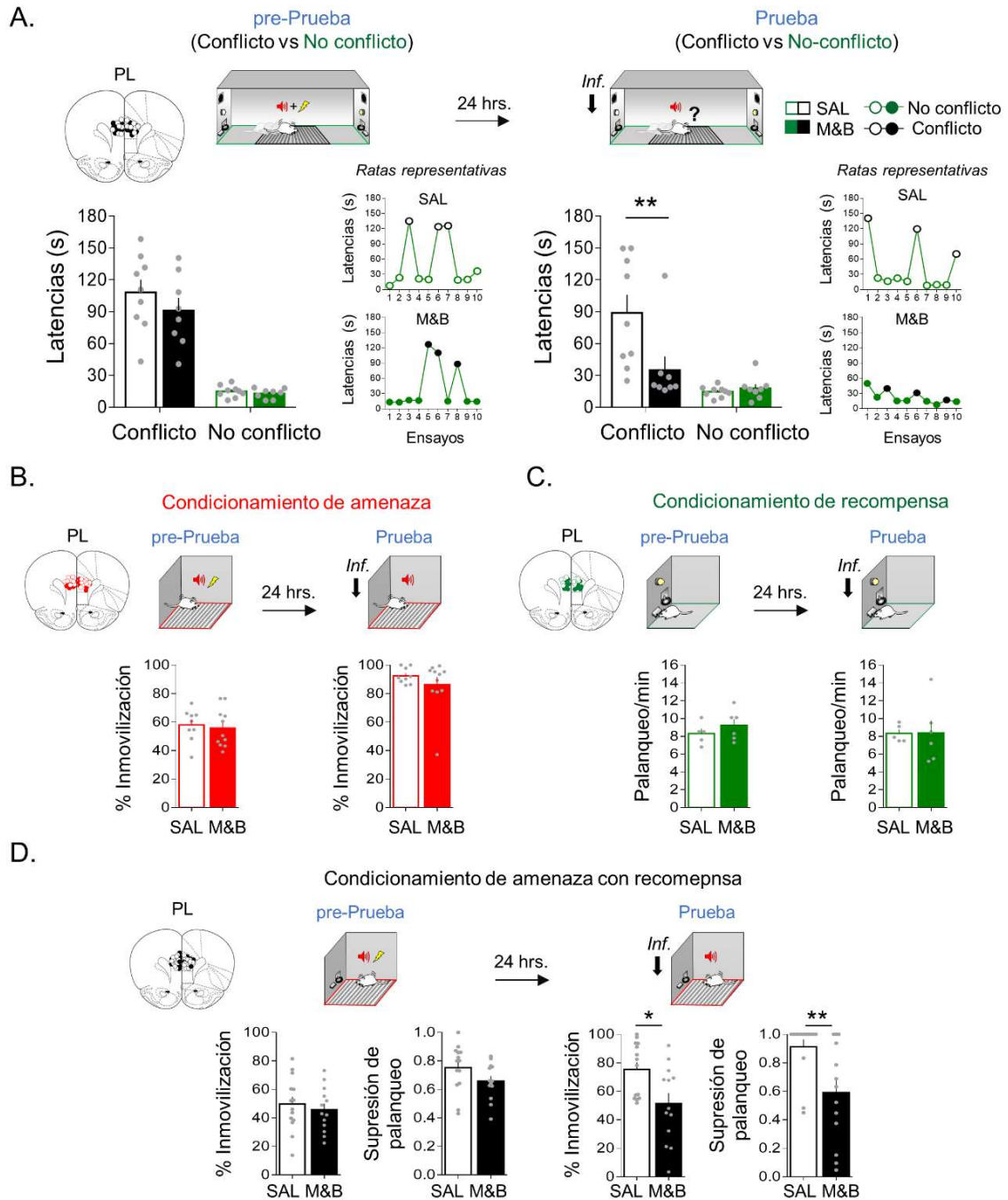
5.2.1 La inactivación de la corteza PL facilita la confrontación de amenazas señalizadas para buscar recompensas

Para evaluar si la corteza PL es necesaria para confrontar amenazas en búsqueda de recompensas, primero, entrenamos a ratas hambrientas en la *tarea de conflicto mediado por cruces* como se describió en la sección experimental I de este trabajo. Cuando las ratas aprendieron a cruzar por comida en condiciones de conflicto y no conflicto, éstas fueron sometidos a una cirugía esterotáxica para implantarles cánulas guía bilaterales en la corteza PL. Después de su recuperación, las ratas fueron reentrenadas en la discriminación de ensayos (4 días) antes de evaluar la inactivación de la corteza PL durante la prueba de conflicto. Todos los animales discriminaron significativamente entre condiciones de conflicto y no conflicto para cruzar por la comida después de la cirugía (datos no graficados, último día del reentrenamiento Conflicto: 100.1 s, No conflicto: 14.0 s, $t_{(16)} = 10.7$, $p = < 0.01$).

A continuación, separamos a los animales en dos grupos de ratas con latencias de cruces similares en los ensayos de conflicto y no conflicto (pre-Prueba, $F_{(1,30)}$ de grupo = 1.25, $p = 0.27$; $F_{(1,30)}$ de ensayo = 99.04, $p < 0.001$, $F_{(1,30)}$ de interacción = 0.80, $p = 0.37$) (**Figura 11A**). Al día siguiente, las ratas fueron probados después de la infusión de solución salina (SAL) o muscimol y baclofeno (M&B) en la corteza PL. Observamos que las ratas que recibieron M&B mostraron un decremento en las latencias de cruces durante los ensayos de conflicto (34.9 s),

Resultados

sin afectar los ensayos de no conflicto, en comparación con las ratas que recibieron SAL (88 s) (Prueba, No conflicto, SAL:14.59 s, M&B: 17.93 s, $F_{(1,30)}$ de grupo = 5.9, $p = 0.02$; $F_{(1,30)}$ de ensayo = 16.88, $p < 0.01$, $F_{(1,30)}$ de interacción = 6.65, $p < 0.05$; prueba Post Hoc: SAL conflicto vs M&B conflicto $p < 0.01$; SAL no conflicto vs M&B no conflicto $p = 0.99$).



Resultados

Figura 11. La inactivación de la corteza PL mejora la respuesta aprendida de búsqueda de recompensas sólo durante condiciones de conflicto. **A**, Ratas entrenadas en la tarea de conflicto mediado por cruces mostraron altas latencias en los ensayos de conflicto en comparación con los ensayos de no conflicto antes de la infusión de solución salina (SAL, n= 9) o muscimol y baclofeno (M&B, n=8). (*Izquierda*: promedio de latencias de cruces de los grupos evaluados; *Derecha*: Desempeño de ratas representativas ensayo por ensayo). Después de la infusión (Prueba), las ratas que recibieron muscimol y baclofeno cruzaron más rápido los ensayos de conflicto, en comparación con los animales tratados con salina (*Izquierda*: promedio de latencias de cruces de los grupos evaluados; *Derecha*: Desempeño de ratas representativas ensayo por ensayo). **B**, Antes (pre-Prueba) y después (Prueba) de la infusión de salina (SAL, n= 9) o muscimol y baclofeno (M&B, n= 11) en las ratas respondieron de manera similar con altos niveles de inmovilización durante el condicionamiento de amenaza. **C**, Antes (pre-Prueba) y después (Prueba) de la infusión de salina (SAL, n= 6) o muscimol y baclofeno (M&B, n= 5) las ratas presionaron una palanca por comida de manera similar durante el condicionamiento de recompensa. **D**, Antes (pre-Prueba) de la infusión de salina (SAL, n=14) o muscimol y baclofeno (M&B, n= 13) las ratas mostraron altos niveles de inmovilización y de supresión de palanqueo durante el condicionamiento de amenaza con recompensa. Después (Prueba) de la infusión, las ratas tratadas con M&B respondieron con menor inmovilización y supresión de palanqueo en comparación con el grupo control. Un esquema representativo de los sitios de infusión de M&B o SAL para cada experimento se muestra arriba de cada gráfica. Los círculos sin relleno representan el grupo control (SAL), el grupo experimental se representa con los círculos rellenos (M&B). Todas las gráficas muestran el promedio y ESM ** p < 0.01, *p < 0.05.

Para corroborar que el efecto observado durante el conflicto se debiera a la inactivación específica de la corteza PL y no de la corteza IL, infundimos M&B o SAL en un grupo de ratas, previamente entrenadas en la *tarea de conflicto mediado por cruces*, canuladas en la corteza IL (datos no graficados). Antes (pre-Prueba) de la desactivación de la corteza IL separamos a los animales en dos grupos con latencias similares en los ensayos de conflicto y no conflicto (pre-Prueba, $F_{(1,12)}$ de grupo = 0.007, $p = 0.93$; $F_{(1,12)}$ de ensayo = 17.11, $p < 0.01$, $F_{(1,30)}$ de interacción = 0.08, $p = 0.77$). Después (Prueba) de la infusión de SAL o M&B en la corteza IL observamos que ambos grupos de ratas mostraron altas latencias de cruces en ensayos de conflicto (SAL: 66.53 s, M&B: 62.46 s) y cortas latencias de cruces en ensayos sin conflicto (SAL: 13.04 s, M&B: 14.30 s) (Prueba, $F_{(1,12)}$ de grupo = 0.03, $p = 0.85$; $F_{(1,12)}$ de ensayo = 17.69, $p < 0.01$, $F_{(1,30)}$ de interacción = 0.13, $p = 0.72$). De modo que, el efecto observado durante el conflicto es específico de la corteza PL.

Dado que la corteza PL codifica información de estímulos que señalizan amenazas, evaluamos si el efecto observado durante el conflicto se debió a un impedimento en la evocación de la memoria de amenaza. Para esto, un grupo de ratas fue entrenado a asociar un

Resultados

tono con una descarga eléctrica en cajas estándar de condicionamiento al miedo (**Figura 11B**). Antes (pre-Prueba) y después (Prueba) de la infusión de SAL o M&B en la corteza PL ambos grupos de animales respondieron con un alto porcentaje de inmovilización durante la presentación del tono condicionado (pre-Prueba, SAL: 58 %, M&B: 55.8 %, $t_{(18)} = 0.38$, $p = 0.70$; Prueba, SAL: 92.4 %, M&B: 86.3%, ($t_{(18)} = 0.9$, $p = 0.33$). Estos datos sugieren que la desactivación de la corteza PL no afecta la respuesta conductual de los animales ante señales que predicen eventos de amenaza.

Posteriormente, evaluamos si la desactivación de la corteza PL afectó la memoria de recompensa durante el conflicto. En principio, podemos inferir que la administración de M&B no alteró la búsqueda de recompensas porque durante los ensayos de no conflicto las ratas tuvieron latencias de cruces similares a las ratas del grupo control. Sin embargo, debido a un efecto piso observado en las latencias de cruces durante condiciones de no conflicto fue difícil determinar si la desactivación de la corteza PL aceleró la búsqueda de recompensas. En este sentido, se infundió SAL o M&B en ratas que fueron entrenadas en el condicionamiento de recompensa (**Figura 11C**). Antes (pre-Prueba) y después (Prueba) de la infusión de M&B en la corteza PL las ratas mostraron una respuesta de palanqueo similar a las ratas que recibieron SAL (pre-Prueba, SAL: 8.3, M&B: 9.2, $t_{(9)} = -1.01$, $p = 0.33$, Prueba SAL: 8.3, M&B: 8.3, $t_{(9)} = -0.04$, $p = 0.96$). Lo anterior sugiere que la desactivación de la corteza PL tampoco afectó la motivación apetitiva de los animales por obtener una recompensa.

Los resultados descritos anteriormente sugieren que la corteza PL es necesaria para responder ante estímulos que señalizan amenazas sólo cuando compiten con la presencia de recompensas. Para corroborar este efecto, infundimos SAL o M&B en ratas que fueron entrenadas en el condicionamiento de amenaza con recompensa (**Figura 11D**). Previo (pre-Prueba) a la desactivación de la corteza PL todos los animales mostraron altos niveles de porcentaje de inmovilización y supresión de palanqueo durante la presentación del tono asociado con la descarga eléctrica (pre-Prueba, Inmovilización, SAL: 49.8%, M&B: 45.7%, $t_{(25)} = 0.68$, $p = 0.54$, Supresión de palanqueo, SAL: 0.75, M&B: 0.65, %, $t_{(25)} = 1.40$, $p = 0.18$). Sin

Resultados

embargo, después (Prueba) de la infusión de M&B las ratas mostraron bajos niveles de inmovilización (SAL: 75.30 %, M&B: 51.55%) y de supresión de palanqueo (SAL: 0.91, M&B: 0.59) en comparación con las ratas que recibieron SAL (Inmovilización, $t_{(25)} = 2.68$, $p < 0.05$, supresión de palanqueo, $t_{(25)} = 2.25$, $p < 0.01$). Por lo que, en una segunda tarea conductual donde se desafía a los animales a responder ante motivaciones opuestas encontramos que la corteza PL es necesaria mejorar la búsqueda de recompensas sólo cuando éstas compiten con la presencia de una amenaza señalizada.

Una vez que corroboramos que la corteza PL es necesaria para responder adecuadamente ante situaciones de conflicto guiadas por el aprendizaje, nos preguntamos si esta corteza también participa en la búsqueda de recompensas innatas cuando hay amenazas señalizadas por el contexto. Para esto, un grupo de ratas previamente canuladas en la corteza PL fue entrenado en la *tarea de conflicto mediada por descenso* como se describió en la primera sección experimental de este trabajo. Posterior al entrenamiento de conflicto, las ratas fueron evaluadas de manera independiente en la prueba de conflicto y no conflicto después de la desactivación de la corteza PL.

Como lo muestra la **figura 12A**, antes de la infusión de SAL o M&B en la corteza PL ambos grupos de animales mostraron altas latencias de bajada por la sacarina en el último día del entrenamiento de conflicto (pre-Prueba SAL: 386.5 M&B: 344.9, $t_{(21)} = 0.3$, $p=0.67$). Al siguiente día, después de la infusión, observamos que las ratas que recibieron M&B (214.3 s) bajaron más rápido de la plataforma que los animales tratados con SAL (517 s) durante la prueba de conflicto ($t_{(23)} = 4.28$, $p < 0.01$). En contraste, durante la prueba de no conflicto observamos que antes (pre-Prueba) y después (Prueba) de la infusión de SAL o M&B las ratas respondieron de manera similar con altas latencias de bajada por la sacarina (pre-Prueba SAL: 371.4 s, M&B: 357.5 s, $t_{(9)} = 0.07$, $p=0.94$; Prueba, SAL: 600 s, M&B: 500 s, $t_{(9)} = 0.90$, $p=0.38$.) (**Figura 12B**). Por lo anterior, podemos sugerir que la corteza PL también es necesaria para que los animales enfrenten una amenaza para buscar una recompensa que de manera natural genera respuestas apetitivas.

Resultados

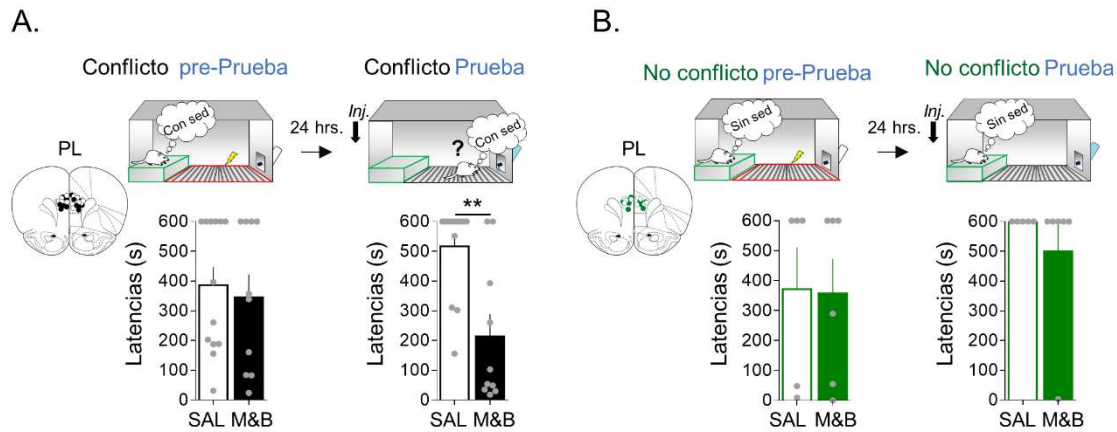


Figura 12. La inactivación de la corteza PL mejora la búsqueda de recompensas innatas sólo cuando compiten con amenazas señalizadas. **A**, Ratitas (sedientas) entrenadas en la tarea de conflicto mediado por descenso mostraron altas latencias de bajada por la sacarina después de recibir una descarga eléctrica antes (pre-Prueba) de la infusión de salina (SAL, n= 13) o muscimol y baclofeno (M&B, n=10). Después (Prueba) de la infusión, las ratitas tratadas con muscimol y baclofen bajaron más rápido por la sacarina que las tratadas con salina. **B**, Antes (pre-Prueba) y después (Prueba) de la infusión de salina (SAL, n= 5) o muscimol y baclofen (M&B, n= 5) las ratitas (sin sed) respondieron con altas latencias de bajada por la sacarina durante la prueba de no conflicto. Un esquema representativo de los sitios de infusión de M&B o SAL para cada experimento se muestra arriba de cada gráfica. Los círculos sin relleno representan el grupo control (SAL), el grupo experimental se representa con los círculos rellenos (M&B). Todas las gráficas muestran el promedio y ESM. ** p < 0.001.

Por último, evaluamos si la corteza PL es necesaria en la respuesta de forrajeo ante la presencia de amenazas innatas (*Conflicto innato mediado por forrajeo*). Para evaluar esto, ratitas canuladas en la corteza PL fueron infundidas con SAL o M&B antes de realizar la prueba de conflicto innato por forrajeo. Encontramos que después de la infusión, las ratitas que fueron tratadas con SAL o M&B mostraron niveles similares de permanencia en el centro con comida (SAL: 37.18 s, M&B: 39.04 s; $t_{(10)} = -0.10$, $p=0.914$) y de distancia recorrida en la arena del campo abierto (SAL: 405.16 s, M&B: 417.12s; $t_{(10)} = -0.29$, $p = 0.89$) (**Figura 13A**). Así mismo, durante la prueba de no conflicto tampoco observamos diferencias en la cantidad de tiempo que las ratitas tratadas con M&B o SAL permanecieron en el centro del campo abierto sin comida (SAL: 13.1, M&B: 12.78, $t_{(10)} = 0.04$, $p = 0.96$) o en la distancia recorrida (SAL: 283.53, M&B: 262.17, $t_{(10)} = 0.60$, $p=0.56$) (**Figura 13B**). Estos datos sugieren que la corteza PL no es necesaria para enfrentar amenazas innatas durante el forrajeo.

Resultados

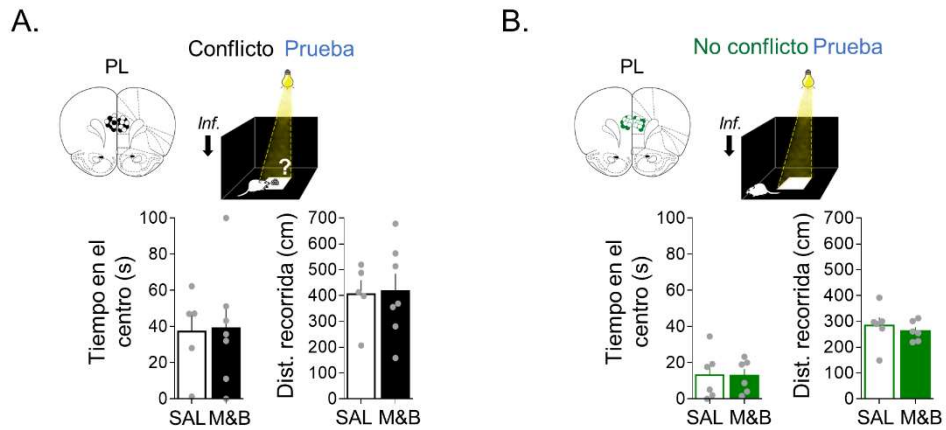


Figura 13. La inactivación de la PL no afecta la conducta de forrajeo por comida ante amenazas innatas. A, Después (Prueba) de la infusión de salina (SAL, n= 5) o muscimol y baclofeno (M&B, n= 7) las ratas permanecieron en el centro (con comida) y recorrieron el campo abierto de manera similar durante la prueba de conflicto. D, Después (Prueba) de la infusión de salina (SAL, n= 6) o muscimol y baclofeno (M&B, n= 6) las ratas permanecieron en el centro y recorrieron el campo abierto de manera similar durante la prueba de no conflicto. Un esquema representativo de los sitios de infusión de M&B o SAL para cada experimento se muestra arriba de cada gráfica. Los círculos sin relleno representan el grupo control (SAL), el grupo experimental se representa con los círculos rellenos (M&B). Todas las gráficas muestran el promedio y ESM ** p < 0.05.

En resumen, encontramos que la inactivación de la corteza PL decrementó las latencias de cruces sólo en ensayos de conflicto. Este efecto no se debió a un impedimento en la evocación de una memoria de amenaza o de recompensa. Sin embargo, sí observamos que la inactivación de esta estructura impidió la evocación de una memoria de amenaza cuando ésta compite con la búsqueda de recompensas. Por último, encontramos que la inactivación de la corteza PL también decrementó las latencias de bajada por sacarina (recompensa innata) en un contexto amenazante sólo cuando los animales están privados de agua (conflicto), pero no incrementó el tiempo de permanencia en el centro iluminado (amenaza innata) de un campo abierto con comida (recompensa innata). Nuestros resultados sugieren que la corteza PL es necesaria para frenar el acto de confrontar amenazas aprendidas cuando éstas compiten con la búsqueda de recompensas.

5.2.2 La inactivación del Núcleo Accumbens anterior mejora la confrontación de amenazas para buscar recompensas durante conflictos innatos y aprendidos

Como se mencionó en los antecedentes de este trabajo, el NAcc procesa información de estímulos que predicen amenazas y recompensas. Adicionalmente, se ha descrito que esta estructura es necesaria para que los animales respondan adecuadamente ante estímulos de valencia motivacional opuesta dependiendo de su eje anteroposterior. Específicamente, la parte anterior de esta estructura es necesaria para regular la conducta apetitiva de ingesta de alimento, mientras que la parte posterior regula respuestas aversivas de defensa (Reynolds and Berridge 2001). Teniendo en cuenta esta diferenciación funcional del NAcc, evaluamos el efecto de la inactivación temporal de esta estructura tanto en su parte anterior como posterior en nuestras tres tareas de conflicto motivacional. A continuación, se describirán los resultados obtenidos con la desactivación del aNAcc, especialmente en la parte *Core*, durante el conflicto.

Entrenamos a un nuevo grupo de ratas en la *tarea de conflicto mediado por cruces*, como se describió previamente, para después ser canulados en el aNAcc. Una vez que los animales se recuperaron de la cirugía, fueron reentrenados en la discriminación de ensayos para comprobar que siguieran recordando la tarea. Al final del reentrenamiento, todos los animales tardaron más tiempo en cruzar los ensayos de conflicto en comparación con los ensayos de no conflicto (datos no graficados, último día del reentrenamiento Conflicto: 77.46 s, No conflicto: 15.9 s, $t_{(16)} = 9.83$, $p < 0.001$).

Posteriormente, separamos a las ratas en dos grupos de animales con latencias de cruces similares en los ensayos de conflicto y no conflicto antes de ser probados con las manipulaciones farmacológicas (pre-Prueba, $F_{(1,30)}$ de grupo = 0.46, $p = 0.50$; $F_{(1,30)}$ de ensayo = 70.02, $p < 0.001$, $F_{(1,30)}$ de interacción = 0.01, $p = 0.90$) (**Figura 14A**). Al día siguiente, se realizó la prueba de conflicto después de la infusión de SAL o M&B en el aNAcc. Las ratas que recibieron M&B mostraron un decremento en las latencias de cruces durante los ensayos de conflicto (42.4 s) en comparación con las ratas que fueron tratadas con SAL (89.4 s), sin

Resultados

afectar las latencias de cruce en los ensayos sin conflicto (SAL: 23.08 s, M&B: 29.4 s) (Prueba, $F_{(1,30)}$ de grupo = 5.2, $p < 0.05$; $F_{(1,30)}$ de ensayo = 19.98, $p < 0.001$, $F_{(1,30)}$ de interacción = 9.02, $p < 0.01$; prueba Post Hoc: SAL conflicto vs M&B conflicto $p < 0.01$; SAL no conflicto vs M&B no conflicto $p = 0.95$).

Al igual que en los experimentos realizados con la corteza PL, probamos si la desactivación del aNAcc afecta de manera independiente cómo responden los animales ante estímulos de valencia motivacional opuesta. Primero, probamos si el aNAcc es necesario para evocar una memoria de amenaza (condicionamiento de amenaza) (**Figura 14B**). Encontramos que la desactivación del aNAcc no impide la evocación de respuestas defensivas ante una amenaza. Antes (pre-Prueba) y después (Prueba) de la infusión de SAL o M&B las ratas respondieron de manera similar con altos niveles de inmovilización durante la presentación del tono aversivo (pre-Prueba, SAL: 54.4 %, M&B: 58.9%, $t_{(9)} = -0.80$, $p = 0.44$; Prueba, SAL: 67.96%, M&B: 71.9 %, $t_{(9)} = -0.30$, $p = 0.76$). De modo que, el aNAcc no es necesario para que los animales respondan adecuadamente ante señales que predicen amenazas.

A continuación, probamos si el NAcc rostral es necesario para evocar una memoria de recompensa (condicionamiento de recompensa) (**Figura 14C**). Encontramos que, antes (pre-Prueba) y después (Prueba) de la infusión de M&B o SAL en el aNAcc, las ratas de ambos grupos mostraron un número similar de presiones de palanca por minuto para obtener la recompensa (pre-Prueba, SAL: 12.27, M&B: 9.60, $t_{(9)} = 1.24$, $p = 0.24$; Prueba, SAL: 12.05, M&B: 9.88%, $t_{(9)} = 0.94$, $p = 0.36$). Estos datos sugieren que el aNAcc tampoco es necesario para la búsqueda de recompensas.

Resultados

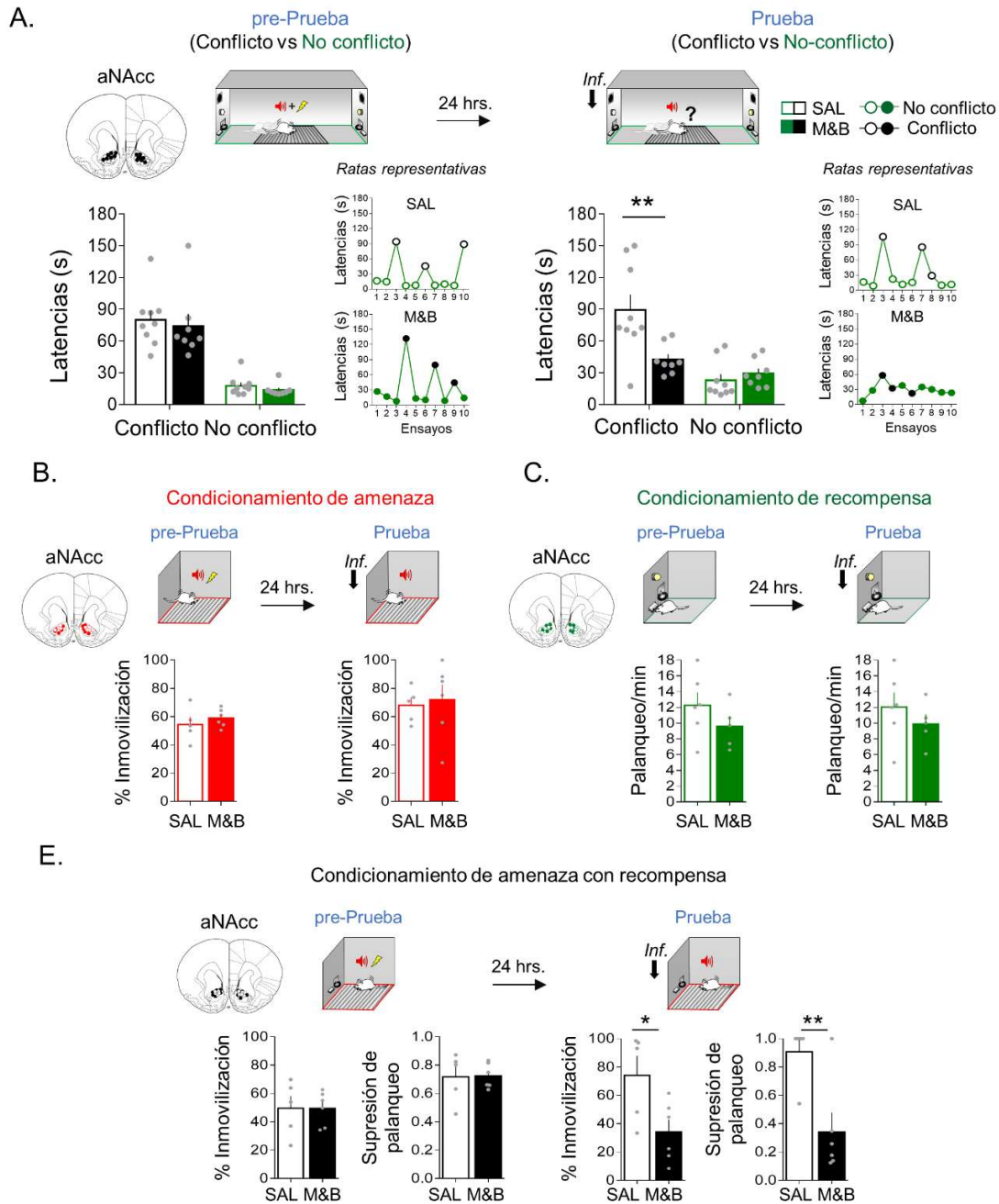


Figura 14. La inactivación del aNAcc mejora la respuesta aprendida de búsqueda de recompensas sólo durante condiciones de conflicto. **A**, Ratas entrenadas en la tarea de conflicto mediado por cruces mostraron altas latencias en los ensayos de conflicto en comparación con los ensayos de no conflicto antes de la infusión de solución salina (SAL, n= 9) o muscimol y baclofeno (M&B, n=8) (*Izquierda*: promedio de latencias de cruces de los grupos evaluados; *Derecha*: Desempeño de ratas representativas ensayo por ensayo). Después de la infusión (Prueba), las ratas que recibieron muscimol y baclofeno cruzaron más rápido los ensayos de conflicto, en comparación con los animales tratados con salina (*Izquierda*: promedio de latencias de cruces de los grupos evaluados; *Derecha*: Desempeño de ratas representativas ensayo por ensayo). **B**, Antes (pre-Prueba) y después (Prueba) de la infusión de salina (SAL, n= 5) o muscimol y baclofen (M&B, n= 6) las ratas respondieron de manera

Resultados

similar con altos niveles de inmovilización durante el condicionamiento de amenaza. **C**, Antes (pre-Prueba) y después (Prueba) de la infusión de salina (SAL, n= 6) o muscimol y baclofeno (M&B, n= 5) las ratas presionaron una palanca por comida de manera similar durante el condicionamiento de recompensa. **D**, Antes (pre-Prueba) de la infusión de salina (SAL, n= 6) o muscimol y baclofen (M&B, n= 5) las ratas mostraron altos niveles de inmovilización y de supresión de palanqueo durante el condicionamiento de amenaza con recompensa. Después (Prueba) de la infusión, las ratas tratadas con M&B respondieron con menor inmovilización y supresión de palanqueo en comparación con el grupo control. Un esquema representativo de los sitios de microinyección de M&B o SAL para cada experimento se muestra arriba de cada gráfica. Los círculos sin relleno representan el grupo control (SAL), el grupo experimental se representa con los círculos rellenos (M&B). Todas las gráficas muestran el promedio y ESM ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

A continuación, corroboramos que el efecto observado con la desactivación del aNAcc se debiera a condiciones de conflicto en una segunda tarea donde estímulos opuestos también compiten por el control de la conducta (condicionamiento de amenaza con palanqueo) (**Figura 14D**). Previo (pre-Prueba) a la infusión de SAL o M&B en el aNAcc los animales de ambos grupos mostraron altos niveles de porcentaje de inmovilización (SAL: 49.57%, M&B:49.46%, $t_{(9)} = 0.01$, $p=0.99$) y de supresión de palanqueo (SAL: 0.78, M&B: 0.73, $t_{(9)} = 0.69$, $p= 0.50$) durante la presentación del tono. Posterior (Prueba) a la infusión, las ratas tratadas con M&B respondieron con bajos niveles de inmovilización y menor supresión del palanqueo durante la presentación del tono aversivo en comparación con el grupo control (Prueba, Inmovilización, SAL: 74.06%, M&B: 34.19 %, $t_{(9)} = 2.53$, $p=0.031$; Supresión de palanqueo, SAL: 0.90, M&B: 0.34, $t_{(9)} = 3.3$, $p=0.009$). De tal modo que, al igual que lo observado con la corteza PL, el aNAcc es necesario para responder adecuadamente ante un estímulo que señala amenaza sólo cuando éste compite con la presencia de recompensas.

Como se mencionó en los antecedentes de este trabajo, el NAcc también participa en el procesamiento de información de estímulos que de manera natural propician respuestas apetitivas y aversivas de los animales. Por lo que, esta estructura también podría regular la respuesta de los animales ante situaciones de conflicto guiadas por estímulos innatos. Para corroborar esto, probamos el efecto de la desactivación del NAcc rostral en la *tarea de conflicto mediado por descenso* y la *tarea de conflicto innato por forrajeo*.

Resultados

Primero, probamos si el aNAcc es necesario para que los animales busquen recompensas innatas a pesar de la presencia de una amenaza señalizada por el contexto. Ratas canuladas en el aNAcc fueron privadas de agua y entrenadas en la *tarea de conflicto mediado por descenso* como se describió anteriormente. Antes (pre-Prueba) de la infusión de SAL o M&B en el aNAcc, los animales mostraron altas latencias de bajada por la sacarina después de la presentación de la descarga eléctrica (pre-Prueba, SAL: 362.77 s, M&B: 299.90s, $t_{(18)} = 0.57$, $p=0.57$) (**Figura 15A**). Después (Prueba) de la infusión, las ratas que recibieron M&B (178.0 s) mostraron un decremento en las latencias de bajada por la sacarina en comparación con el grupo de ratas que recibieron SAL (441.1 s) durante la prueba de conflicto (Prueba, $t_{(18)} = 2.85$, $p < 0.05$).

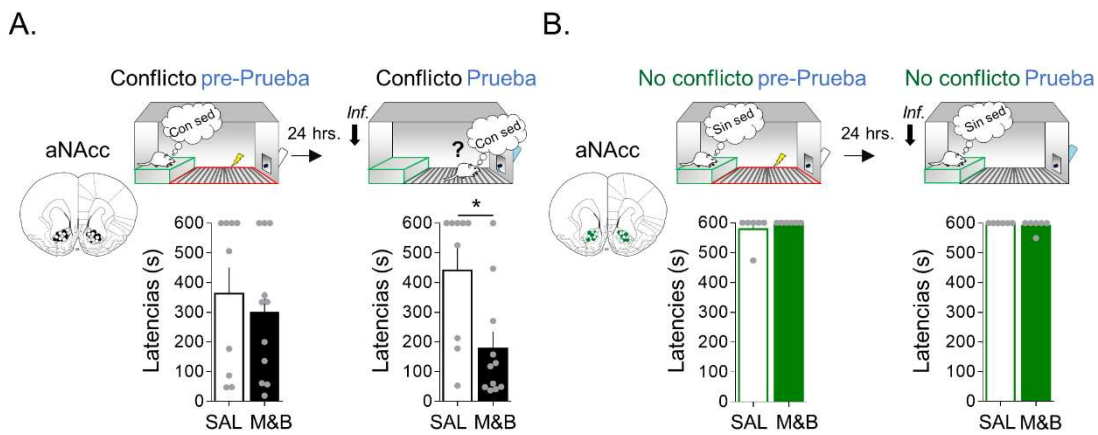


Figura 15. La inactivación del aNAcc mejora la búsqueda de recompensas innatas sólo cuando compiten con amenazas señalizadas. **A**, Ratas (sedientas) entrenadas en la tarea de conflicto mediado por descenso mostraron altas latencias de bajada por la sacarina después de recibir una descarga eléctrica antes (pre-Prueba) de la infusión de salina (SAL, n= 9) o muscimol y baclofeno (M&B, n=11). Después (Prueba) de la infusión, las ratas tratadas con muscimol y baclofen bajaron más rápido por la sacarina que las tratadas con salina. **B**, Antes (pre-Prueba) y después (Prueba) de la infusión de salina (SAL, n= 6) o muscimol y baclofen (M&B, n= 6) las ratas (sin sed) respondieron con altas latencias de bajada por la sacarina durante la prueba de no conflicto. Un esquema representativo de los sitios de microinyección de M&B o SAL para cada experimento se muestra arriba de cada gráfica. Los círculos sin relleno representan el grupo control (SAL), el grupo experimental se representa con los círculos rellenos (M&B). Todas las gráficas muestran el promedio y ESM, * $p < 0.05$.

Resultados

Por su parte, encontramos que la desactivación del aNAcc no afecta las latencias de bajada durante condiciones de no conflicto (**Figura 15B**). Antes (pre-Prueba) y después (Prueba) de la infusión de SAL o M&B ambos grupos de ratas respondieron de manera similar con altas latencias de bajada por la sacarina (pre-Prueba, SAL: 579.0 s, M&B: 600 s, $t_{(10)} = -1.0$, $p = 0.34$; Prueba, SAL: 600.0 s, M&B 591.6 s, $t_{(10)} = 1.0$, $p=0.34$). Estos resultados sugieren que, el aNAcc también es necesario para mejorar la búsqueda de recompensas sólo en condiciones de conflicto motivacional.

Más adelante, evaluamos la participación del aNAcc en la conducta de forrajeo durante la presencia de amenazas innatas (**Figura 16A**). Después de recibir una infusión de M&B (63.92 s) en el aNAcc las ratas mostraron un incremento en el tiempo que permanecieron en el centro del campo abierto forrajeando por comida en comparación con el grupo control (SAL 26.65 s, $t_{(16)} = -2.85$, $p < 0.05$). La infusión de M&B no alteró la locomoción puesto que, ambos grupos de animales recorrieron la arena del campo abierto de manera similar (Distancia recorrida, SAL: 366.11 cm, M&B: 446.66 cm, $t_{(16)} = -1.60$, $p = 0.12$).

Para evaluar si el efecto observado con la desactivación del aNAcc durante el forrajeo se debió a un incremento en la motivación apetitiva de los animales por la comida, probamos si la infusión de M&B altera la cantidad de comida que consumen las ratas en sus cajas hogar durante la prueba de ingesta de alimento durante un día (**Figura 16B**). Después de la infusión, las ratas tratadas con M&B (4.71 g) consumieron la misma cantidad de pellets que las ratas del grupo control (SAL 4.6 g; $t_{(10)} = 0.28$, $p=0.78$). Con lo cual, podemos sugerir que el aNAcc también es necesario para regular la conducta innata de forrajeo por comida durante la presencia de amenazas naturales sin afectar la ingesta de alimento.

Finalmente corroboramos que el efecto encontrado en esta sección con la inactivación del aNAcc se debiera a la parte *Core* y no a la parte *Shell* de esta estructura. Para esto, infundimos M&B o SAL en el NAcc *Shell* de ratas entrenadas en la *tarea de conflicto mediado por descenso* (datos no graficados). Después (Prueba) de la infusión de M&B, las ratas respondieron de manera similar al grupo SAL con altas latencias de bajada para ir por la

Resultados

sacarina durante el conflicto (Prueba, SAL: 416.6 s, M&B: 418.2 s; $t_{(11)}$: -0.0, $p= 0.973$). Este resultado sugirió que el NAcc *Shell* no es necesario al momento de enfrentar una amenaza para obtener una recompensa durante el conflicto. A partir de este resultado, todas nuestras manipulaciones con NAcc fueron realizadas en la parte *Core* y no en la parte *Shell* de esta estructura.

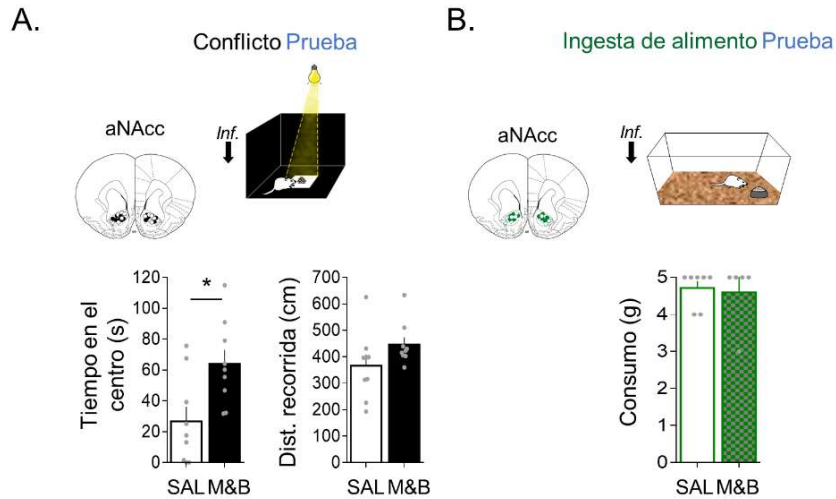


Figura 16. La inactivación del aNAcc mejora la conducta de forrajeo por comida a pesar de la presencia de una amenaza innata. **A**, Después (Prueba) de la infusión de muscimol y baclofen (M&B, $n= 9$) las ratas incrementaron el tiempo que permanecieron en el centro del campo abierto con comida, sin alterar la distancia recorrida, en comparación con las ratas tratadas con salina (SAL, $n= 9$). **B**, Después (Prueba) de la infusión de M&B ($n= 5$) las ratas consumieron la misma cantidad de alimento que las ratas del grupo control (SAL, $n= 7$). Un esquema representativo de los sitios de microinyección de M&B o SAL para cada experimento se muestra arriba de cada gráfica. Los círculos sin relleno representan el grupo control (SAL) mientras que el grupo experimental se representa con los círculos rellenos (M&B). Todas las gráficas muestran el promedio y ESM * $p < 0.05$.

Para resumir, al igual que lo observado con la corteza PL, encontramos que la inactivación del aNAcc decrementó las latencias de cruces sólo en ensayos de conflicto, sin afectar la respuesta conductual de los animales ante estímulos que predijeron la ocurrencia de amenazas o recompensas. Observamos que la inactivación de esta estructura decrementó la respuesta de inmovilización ante un tono aversivo cuando éste compitió con la presencia de recompensas (condicionamiento aversivo). Así mismo, encontramos que la inactivación del aNAcc decrementó las latencias de bajada por sacarina (recompensa innata) en un contexto

Resultados

amenazante sólo cuando los animales están privados de agua (conflicto). Por último, la inactivación del aNAcc también incrementó el tiempo que permanecieron los animales forrajeando por comida a pesar de la presencia de una amenaza natural. De tal forma que, estos resultados nos permiten inferir que el aNAcc es necesario para frenar el acto de confrontar amenazas aprendidas e innatas cuando éstas compiten con la búsqueda de recompensas.

5.2.3. La inactivación del Núcleo Accumbens posterior impide la búsqueda de recompensas cuando se debe realizar una respuesta instrumental en presencia y ausencia de conflicto

A continuación, evaluamos si el pNAcc es necesario para enfrentar amenazas en búsqueda de recompensas durante el conflicto. Primero, entrenamos a un grupo de ratas en la *tarea de conflicto mediado por cruces* como se describió en la primera sección experimental de este trabajo. Después de ser canuladas, las ratas fueron reentrenadas en la discriminación de ensayos de conflicto y no conflicto para obtener comida. Todos los animales utilizados en este experimento mostraron altas latencias de cruces por la recompensa en ensayos de conflicto y cortas latencias de cruces en condiciones sin conflicto (datos no graficados, último día de reentrenamiento, SAL: 23.37 s, M&B: 82.15 s, $t_{(17)} = 8.2$, $p < 0.001$).

Para evaluar el efecto de la inactivación del pNAcc en la tarea de cruces de conflicto separamos a los animales en dos grupos de ratas con latencias de cruces similares (pre-Prueba, $F_{(1,32)}$ de grupo = 0.17, $p = 0.67$; $F_{(1,32)}$ de ensayo = 29.58, $p = 0.00$, $F_{(1,32)}$ de interacción = 0.04, $p = 0.83$) (**Figura 17A**). Después (Prueba) de la infusión de SAL o M&B en el pNAcc, encontramos que las ratas tratadas con M&B incrementaron sus latencias de cruces por la recompensa durante los ensayos de conflicto (SAL: 96.36s, M&B: 160.76 s; $t_{(16)} = -4.1$, $p < 0.001$), pero también en los ensayos de no conflicto (SAL: 18.37 s, M&B: 124.71 s; $t_{(16)} = -5.2$, $p < 0.001$). Es decir, el bloqueo de la actividad del pNAcc afectó la búsqueda de recompensas con y sin presencia de una amenaza señalizada.

Resultados

de manera similar con altos niveles de inmovilización durante el condicionamiento de amenaza. **C**, Antes (pre-Prueba) de la infusión de salina ($n= 6$) o muscimol y baclofeno (M&B, $n=5$) las ratas presionaron una palanca por comida de manera similar durante el condicionamiento de recompensa. Después de la infusión (Prueba), las ratas tratadas con muscimol y baclofeno disminuyeron las presiones de palanca en comparación con las ratas tratadas con salina. **D**, Después (Prueba) de la infusión de salina (SAL, $n= 5$) ($n= 5$) o muscimol y baclofeno (M&B, $n= 5$) las ratas consumieron la misma cantidad de pellets durante la prueba de ingesta de alimento. **E**, Después (Prueba) de la infusión, los animales tratados con salina (SAL, $n=6$) o muscimol y baclofeno (M&B, $n=5$) recorrieron el campo abierto y la viga elevada de manera similar. Un esquema representativo de los sitios de microinyección de M&B o SAL para cada experimento se muestra arriba de cada gráfica. Los círculos sin relleno representan el grupo control (SAL), el grupo experimental se representa con los círculos rellenos (M&B). Todas las gráficas muestran el promedio y ESM *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

Al igual que en las secciones anteriores, realizamos varios experimentos control para explicar los efectos encontrados durante la tarea cruces de conflicto. Siguiendo la lógica de los experimentos pasados, primero evaluamos el efecto de la inactivación del pNAcc en el condicionamiento de amenaza (**Figura 17B**). Antes (pre-Prueba) y después (Prueba) de la infusión de SAL o M&B en el pNAcc, ambos grupos de ratas respondieron con altos niveles de porcentaje de inmovilización durante la presentación del tono asociado con la descarga eléctrica (pre-Prueba SAL: 46.20 %, M&B: 51.49%, $t_{(9)} = -0.58$, $p = 0.56$; Prueba, SAL: 72.66%, M&B: 70.68%, $t_{(9)} = 0.15$, $p=0.89$). Lo anterior sugiere que el pNAcc no es necesario para responder adecuadamente ante la presencia de una amenaza señalizada y por tanto no explica lo encontrado durante el conflicto.

Más adelante, evaluamos si la inactivación del pNAcc afectó la memoria de recompensa en un grupo de ratas entrenadas a presionar una palanca por comida (condicionamiento de recompensa) (**Figura 17C**). Antes (pre-Prueba) de la infusión de SAL o M&B en el pNAcc, las ratas presionaron una palanca para obtener comida de manera similar (pre-Prueba, SAL: 14.23, M&B 13.56, $t_{(8)} = -0.35$, $p = 0.72$). Después de la infusión, las ratas tratadas con M&B (2.23 palanqueos) mostraron un decremento en la respuesta de palanqueo por comida en comparación con las ratas tratadas con SAL (Prueba, SAL: 12.2, M&B: 3.74, $t_{(8)} = 3.74$, $p < 0.001$); sugiriendo que el pNAcc es necesario para que las ratas ejecuten de manera correcta respuestas instrumentales para obtener una recompensa.

Resultados

Una nueva pregunta que surgió con el efecto encontrado en la respuesta de palanqueo fue si la administración de M&B en el pNAcc afectó la motivación de las ratas para consumir los pellets y por eso dejaron de presionar la palanca. Se infundió SAL o M&B en el pNAcc antes de realizar una prueba de ingesta de alimento, durante un día, en las cajas hogar de las ratas (**Figura 17D**). Observamos una ligera tendencia de un menor consumo de pellets en las ratas que recibieron M&B (3.2 g) en comparación con el grupo control (SAL, 4.80g, $t_{(8)} = 2.10$, $p = 0.0689$). Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa para explicar los resultados encontrados en la respuesta de búsqueda de recompensa.

Posteriormente, corroboramos que el efecto encontrado con la desactivación del pNAcc en el condicionamiento de recompensa y los cruces de conflicto no se debiera a un impedimento en la locomoción y la coordinación motora. Infundimos SAL o M&B en el pNAcc antes de probar a las ratas en el campo abierto y la viga elevada (**Figura 17E**). Observamos que las ratas que recibieron M&B recorrieron de manera similar la arena del campo abierto (SAL: 325.44 cm, M&B:268.57 cm, $t_{(9)} = 0.86$, $p = 0.40$) que las ratas del grupo control. Así mismo, la inactivación del pNAcc no afectó el tiempo que tardaron las ratas con M&B en llegar al final de la viga elevada (SAL: 8.16 s, M&B: 10.0 s, $t_{(9)} = -0.34$, $p = 0.73$) comparadas con las ratas tratadas con SAL. Lo anterior, sugiere que el pNAcc no es necesario para la motricidad y locomoción de los animales y por tanto, el efecto observado en el decremento de la respuesta instrumental de palanqueo no se debió a un problema motor.

De modo que, el incremento observado en las latencias de cruces durante los ensayos de conflicto y no conflicto se debió, en primera instancia, a que los animales que recibieron M&B fueron incapaces de realizar respuestas instrumentales para conseguir la recompensa. A continuación, nos preguntamos si esta estructura también es importante para aquellos conflictos motivacionales que son guiados por estímulos innatos y que no dependen en su totalidad de respuestas instrumentales para obtener la recompensa.

Primero, entrenamos a ratas canuladas en el pNAcc en la *tarea de conflicto mediado por descenso* como se mencionó en la primera sección experimental de este trabajo. Antes

Resultados

(pre-Prueba) de la infusión de SAL o M&B en el pNAcc las ratas fueron separadas en dos grupos con altas latencias de bajada en el último día del entrenamiento (SAL: 222.62, M&B: 254.90, $t_{(17)} = -0.32$, $p = 0.74$) (**Figura 18A**). Después (Prueba) de la infusión, ambos grupos de animales respondieron con altas latencias de bajada durante la prueba de conflicto ($t_{(17)} = 0.66$, $p = 0.51$). Lo cual, sugirió que el pNAcc no es necesario para enfrentar una amenaza señalizada para poder acercarse a una recompensa innata.

A continuación, evaluamos si el pNAcc participa en la conducta de forrajeo durante condiciones de conflicto (*tarea de conflicto innato mediado por forrajeo*). Como se muestra en la **figura 18B**, las ratas que recibieron M&B en el pNAcc mostraron una permanencia similar en el centro con comida y una distancia similar para recorrer el campo abierto que las ratas tratadas con SAL durante la prueba de conflicto. De modo que, el pNAcc tampoco es necesario para que las ratas enfrenten amenazas innatas mientras forrajean por comida.

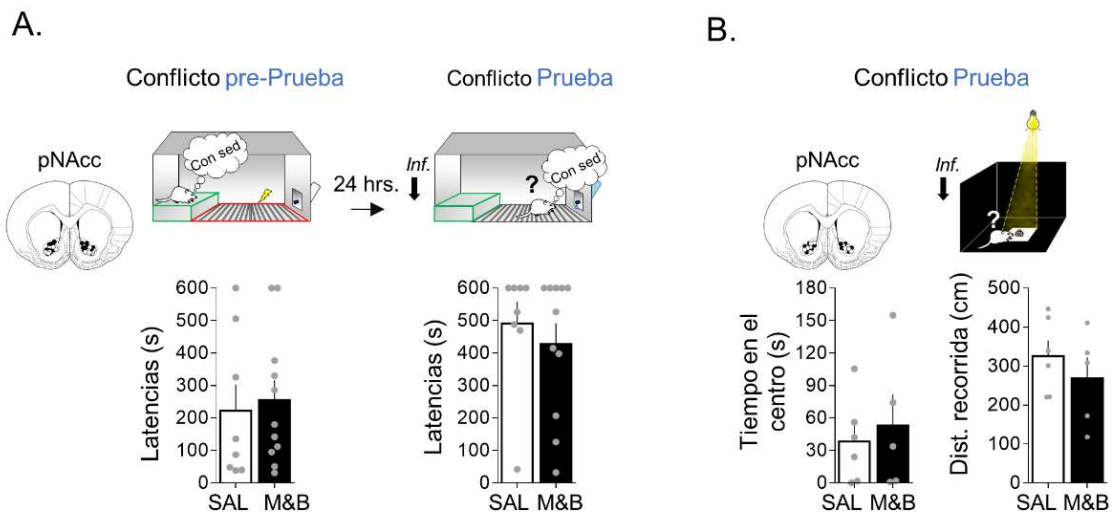


Figura 18. La inactivación del pNAcc no afecta la búsqueda de recompensas innatas en presencia de amenazas naturales y aprendidas. **A**, Antes (pre-Prueba) y después (Prueba) de la infusión de salina (SAL, $n = 8$) o muscimol y baclofeno (M&B, $n = 11$) las ratas respondieron con altas latencias de bajada por la sacarina. **B**, Después (Prueba) de la infusión de salina (Sal, $n = 6$) o muscimol y baclofeno (M&B, $n = 5$) permanecieron la misma cantidad de tiempo en el centro del campo abierto con comida. Un esquema representativo de los sitios de infusión de M&B o SAL para cada experimento se muestra arriba de cada gráfica. Los círculos sin relleno representan el grupo control (SAL), el grupo experimental se representa con los círculos rellenos (M&B). Todas las gráficas muestran el promedio y ESM

Resultados

En resumen, la inactivación del pNAcc incrementó la latencia de cruces por la recompensa en ensayos de conflicto y no conflicto. Encontramos que este efecto se debió a que la administración de agonistas GABAérgicos en esta estructura impide que un animal presione una palanca por comida (respuesta instrumental), sin afectar la evocación de una memoria de amenaza, la ingesta de alimento, la locomoción y coordinación motora. Por último, observamos que la inactivación del pNAcc no afectó la búsqueda de recompensas innatas durante condiciones de conflicto ni el tiempo que estuvieron los animales forrajeando ante la presencia de una amenaza innata. Por lo que, nuestros resultados sugieren que el pNAcc es necesario para ejecutar correctamente respuestas instrumentales por la búsqueda de recompensas sin importar si éstas compiten o no con una amenaza.

Para recapitular, durante los experimentos con inactivaciones farmacológicas hallamos lo siguiente: 1) La corteza PL es necesaria para frenar el acto de confrontar amenazas señalizadas por estímulos aprendidos (tono, contexto etc.) sólo cuando éstas compiten con la presencia de recompensas (aprendidas e innatas). 2) El aNAcc es necesario para ralentizar el acto de confrontar amenazas aprendidas e innatas sólo cuando éstas compiten con la presencia de recompensas (aprendidas e innatas). 3) El pNAcc es necesario para la correcta ejecución de respuestas instrumentales por recompensas durante la presencia y ausencia de amenazas señalizadas.

5.2.4 La fotoinhibición de la vía corteza PL → NAcc anterior mejora la búsqueda de recompensas a pesar de la presencia de una amenaza aprendida

Anatómicamente, se sabe que existe una proyección glutamatérgica de la corteza PL hacia el NAcc (Vertes 2004). En este sentido, esta proyección podría regular la búsqueda de recompensas durante situaciones de conflicto. Después de observar efectos similares con la desactivación farmacológica de la corteza PL y el aNAcc durante la *tarea de conflicto mediado por cruces*, nos preguntamos si es necesaria la comunicación entre ambas estructuras para regular el acto de confrontar una amenaza señalizada en búsqueda de recompensas. Para

Resultados

explorar esta posibilidad se fotoinhibió de manera específica los axones glutamatérgicos de la corteza PL aferentes al aNAcc durante una prueba de conflicto motivacional.

Antes de probar si la vía PL→aNAcc es necesaria para regular la búsqueda de recompensas ante la presencia de conflicto, primero evaluamos el tiempo de infección requerido para observar axones aferentes de la corteza PL en el aNAcc. Para esto, sometimos a ratas a una cirugía esterotáxica para infundir un vector viral con el constructo AAV5-CamKII-eArch3.0-EYFP (Arch3.0-eYFP). Después de 6 semanas de infección las ratas fueron sacrificadas para poder evaluar si este tiempo fue suficiente para observar axones de la corteza PL en el NAcc. La **figura 19B** muestra el sitio de infección de la proteína Arch3.0 en la corteza PL y la marca de axones aferentes en el aNAcc, sugiriendo que 6 semanas de infección son suficientes para poder manipular la vía PL→aNAcc durante el conflicto.

A continuación, se entrenó a un nuevo grupo de ratas en la *tarea conflicto mediado por cruces* (de acuerdo con lo mostrado en la sección experimental I). Posterior al entrenamiento de discriminación, las ratas se sometieron a una cirugía esterotáxica para infundir dos vectores virales con el constructo AAV5-CamKII-eArch3.0-EYFP (Arch3.0-eYFP) o el constructo AAV5-CamKII-EYFP (eYFP). En la misma cirugía se implantaron 2 fibras ópticas bilaterales en el aNAcc.

Para realizar la fotoinhibición de los axones de la corteza PL en el aNAcc durante la prueba de conflicto en ausencia de la descarga eléctrica, se presentaron dos bloques de 10 ensayos de cruces con el 10% de probabilidad de correnca del conflicto. Es decir, 9 ensayos fueron de no conflicto y sólo un ensayo fue de conflicto para cada bloque. En el primer bloque de ensayos se fotoinhibió la vía PL→aNAcc (láser *On*, $\lambda = 535$ nm, pulso continuo, 12 mW), durante un ensayo de conflicto y uno de no conflicto elegidos de manera aleatorizada (B1: láser *On*). Mientras que, durante el bloque 2 la vía PL→aNAcc no se fotoinhibió (B2: láser *Off*) (**Figura 19C**).

Resultados

La **figura 19D** muestra el efecto observado durante la fotoinhibición de la vía PL→NAcc en los ensayos de conflicto. Como lo muestra la gráfica de líneas, los animales que expresaron la proteína Arch (Arch3.0-eYFP: 98.30 s) mostraron una disminución en la latencia de cruces en comparación con los animales que sólo expresaron la proteína eYFP (162.89 s) durante el primer bloque de ensayos con el láser encendido ($t_{(13)} = 3.14$, $p=0.007$). Mientras que, ambos grupos de animales mostraron altas latencias de cruces en los ensayos de conflicto durante el bloque 2 donde el láser se mantuvo apagado (láser *off*, eYFP: 121.24 s, Arch3.0-eYFP: 149.55 s, $t_{(13)} = -1.46$, $p=0.16$) De modo que, la fotoinhibición en el aNAcc de los axones provenientes de la corteza PL decrementó el tiempo que tardaron los animales en enfrentar una amenaza para conseguir una recompensa.

De manera adicional, comparamos las latencias de cruces de los ensayos de conflicto durante el bloque 1 (láser *On*) versus el bloque 2 (láser *Off*) de los animales que expresaron eYFP o Arch3.0-eYFP (**figura 19D derecha**). Como se observa en las gráficas de barras, los animales que sólo expresaron la proteína eYFP decrementaron sus latencias de cruces durante el bloque 2 (láser *Off*) en comparación con el bloque 1 (láser *On*) (eYFP, B1: 162.89 s, B2: 121.24 s, $t_{(6)} = 3.68$, $p=0.01$); un resultado esperado ante la ausencia de la descarga eléctrica (extinción). Mientras que, los animales que expresaron la proteína Arch incrementaron sus latencias de cruces en el boque 2 (láser *Off*) en comparación con el bloque 1 (láser *On*) (Arch3.0-eYFP, B1: 98.30 s, B2: 149.55, $t_{(7)} = -2.40$ $p=0.04$). Nótese que los animales que expresaron la proteína Arch en lugar de decrementar las latencias de cruces en el bloque 2, por la ausencia de la descarga eléctrica, cruzaron el ensayo de conflicto de manera similar al grupo e-YFP en el primer bloque de ensayos (Arch3.0-eYFP, B2: 149.55 s, eYFP, B1: 162.89 s, $t_{(13)} = 0.74$, $p=0.47$). Esto sugiere que los animales con la vía PL→aNAcc fotoinhibida cruzaron el segundo ensayo de conflicto como si fuera el primer ensayo.

Resultados

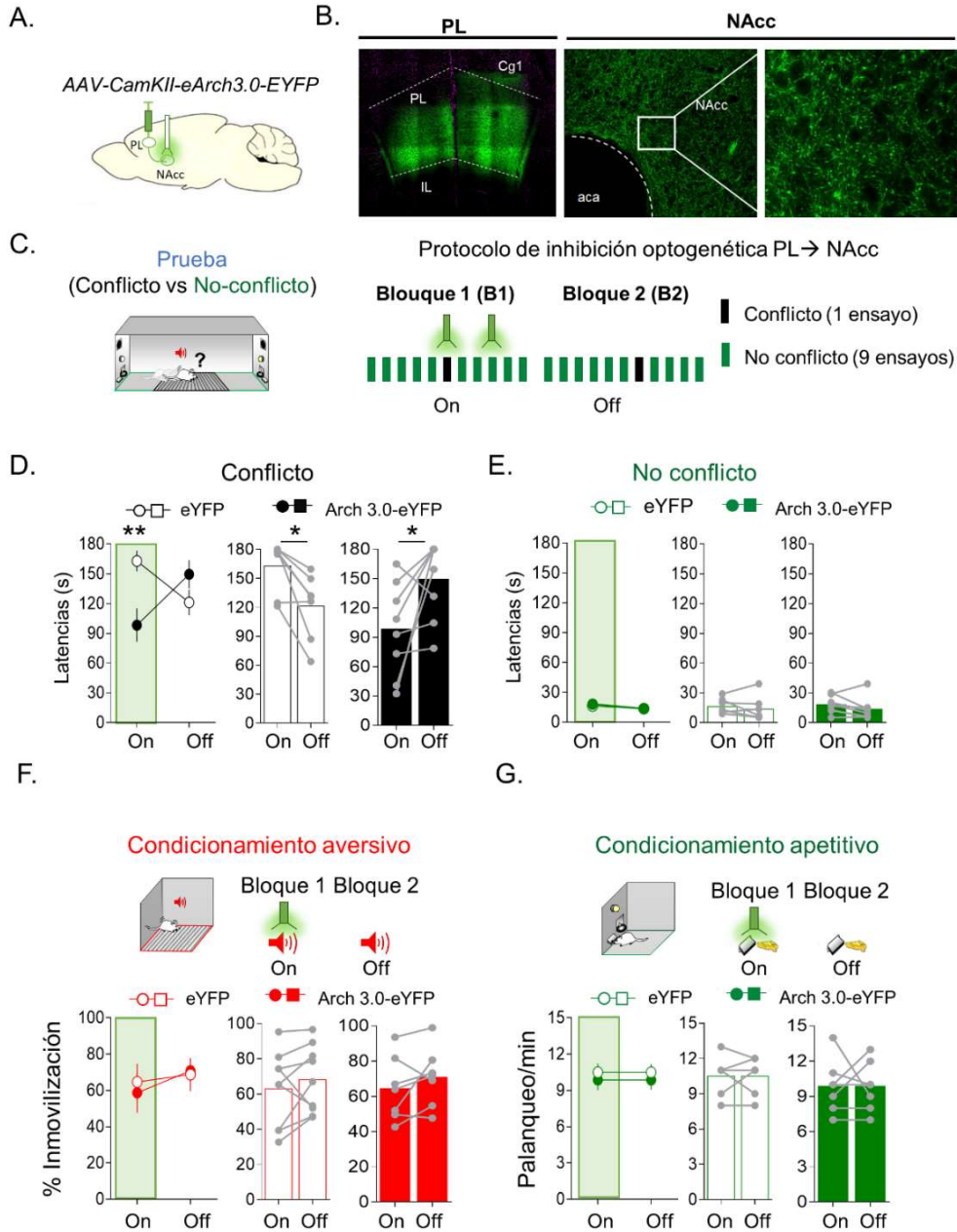


Figura 19. La fotoinhibición de la vía PL→NAcc mejora la búsqueda de recompensas sólo durante condiciones de conflicto. **A**, Protocolo de infección (Infusión del vector viral AAV5-CamKII-eArch3.0-EYFP). **B**, Infección en la corteza prefrontal. Axones provenientes de la corteza prefrontal en el Núcleo Accumbens. **C**, Protocolo de inhibición optogenética. Se presentaron 2 bloques con 10 ensayos de cruces conformados por un ensayo de conflicto y 9 ensayos de no conflicto. Se fotoinhibió la vía PL→NAcc sólo en el primer bloque, pero no en el segundo (B1, on; B2 off). **D**, Las ratas infectadas con Arch3.0-eYFP (n= 8) cruzaron más rápido los ensayos de conflicto durante el bloque 1 en comparación con las ratas infectadas con e-YFP (n=6). Por su parte durante el bloque 2, las ratas infectadas con Arch3.0-eYFP tardaron más tiempo en cruzar los ensayos de conflicto en

Resultados

comparación con las ratas infectadas con e-YFP. **E**, Las ratas infectadas con Arch3.0-eYFP cruzaron los ensayos de no conflicto de manera similar que las ratas infectadas con e-YFP durante el bloque 1 y bloque 2. **F**, Durante la evocación de una memoria de amenaza se fotoinhibió la vía PL→NAcc durante la presentación del primer tono condicionado (B1, *on*), pero no en el segundo (B2, *off*). Las ratas infectadas con Arch3.0-eYFP (n= 7) mostraron niveles similares de inmovilización que las ratas infectadas con e-YFP (n= 6) durante el bloque 1 y bloque 2. **G**, Durante la evocación de una memoria de recompensa se fotoinhibió la vía PL→NAcc durante el primer minuto de la prueba (B1, *on*), pero no en el segundo minuto (B2, *off*). Las ratas infectadas con Arch3.0-eYFP presionaron una palanca para obtener comida de manera similar que las ratas infectadas con e-YFP durante el bloque 1 y bloque 2. Los puntos y líneas grises muestran el desempeño individual de las ratas antes y después de la fotoinhibición de la vía PL→NAcc. ** p < 0.01, * p < 0.5.

Por su parte, durante la presentación de los ensayos de no conflicto ambos grupos de animales cruzaron de manera similar por la recompensa durante el bloque 1, (láser *On*, eYFP :16.25 s, Arch-eYFP: 18.2 s, $t_{(13)}=0.46$, $p=0.65$) y el bloque 2 (láser *Off*, eYFP: 13.71s, Arch-eYFP:13.50 s, $t_{(13)}=0.03$, $p=0.97$) (**Figura 19E**). No observamos diferencias en la conducta al comparar las latencias de cruces en el bloque 1 (láser *On*) versus el bloque 2 (láser *Off*) intra grupo (eYFP, láser *On*: 16.25 s, láser *Off*: 13.71 s, $t_{(6)}= 0.83$, $p=0.43$; Arch3.0-eYFP, láser *On*: 18.22 s, láser *Off*: 13.5 s, $t_{(7)}= 1.69$, $p=0.13$). Lo anterior es consistente con los resultados obtenidos con las inactivaciones farmacológicas de la corteza PL y aNAcc en donde sólo disminuyeron las latencias cruces en ensayos de conflicto.

Posteriormente, evaluamos si el efecto descrito anteriormente se debió a un impedimento de la evocación de la memoria de amenaza. Para esto, los animales utilizados en el experimento anterior fueron entrenados en el condicionamiento de amenaza y se evaluó 24 horas después la respuesta de inmovilización durante una prueba. Se fotoinhibió la vía PL→NAcc durante la presentación del primer tono aversivo (30 s, Bloque 1, láser *On*) pero no así durante la presentación del segundo tono (30 s, Bloque 2, láser *Off*) (**Figura 19F**). Observamos que tanto los animales que expresaron únicamente la proteína eYFP como los que expresaron la proteína Arch (Arch3.0-eYFP) mostraron un alto porcentaje de inmovilización durante el primer bloque (láser *On*, eYFP: 64.66%, Arch3.0-eYFP: 58.66%, $t_{(11)}= 0.39$, $p=0.69$) y el segundo bloque (láser *Off*, eYFP: 68.72 %, Arch-eYFP: 70.85 %, $t_{(11)}= -0.19$, $p= 0.84$). Adicionalmente, las gráficas de barras (*derecha*) muestran el porcentaje de inmovilización de

Resultados

los animales durante el bloque 1 (láser *On*) comparado con el bloque 2 (láser *Off*) para cada grupo de ratas evaluadas. Tampoco observamos diferencias en la respuesta de inmovilización de los animales de manera intra grupos (eYFP, $t_{(5)} = -1.10$, $p = 0.31$; Arch3.0-eYFP, $t_{(6)} = 1.49$, $p = 0.18$). Lo anterior sugiere que la vía PL→NAcc no es necesaria para que los animales respondan correctamente ante la presencia de estímulos que señalizan amenazas.

Por último, evaluamos si la fotoinhibición de la vía PL→NAcc afectó la búsqueda de recompensas. Para ello, se fotoinhibió la vía PL→NAcc durante el primer minuto que las ratas estuvieron presionando la palanca por comida (60 segundos, Bloque 1, láser *On*) pero no así durante el segundo minuto de la tarea (60 segundos, Bloque 2, láser *Off*) (**Figura 19G**). Observamos que tanto los animales que expresaron la proteína eYFP como los que expresaron la proteína Arch (Arch3.0-eYFP) mostraron niveles similares de palanqueo durante el primer bloque (láser *On*, eYFP: 10.50, Arch3.0-eYFP: 9.57, $t_{(11)} = 1.02$, $p = 0.32$) y segundo bloque (B2, láser *Off*, eYFP: 10.0, Arch3.0-eYFP: 9.85, $t_{(11)} = 0.12$, $p = 0.90$). Las gráficas de barras (*derecha*) muestran los eventos de palanqueo de los animales durante el bloque 1 (láser *On*) comparado con el bloque 2 (láser *Off*) para cada grupo de ratas evaluadas. Tampoco observamos diferencias en la respuesta de palanqueo de los animales de manera intra grupos (eYFP, $t_{(5)} = -1.10$, $p = 0.31$; Arch3.0-eYFP, $t_{(6)} = 1.49$, $p = 0.18$). Lo anterior sugiere que la vía PL→NAcc no es necesaria para que los animales ejecuten las respuestas apropiadas para buscar recompensas.

En conjunto, nuestros hallazgos con la manipulación de la proyección PL→NAcc durante el conflicto sugieren que la corteza PL regula el acto de enfrentar activamente amenazas para obtener recompensas a través de su correcta comunicación con el NAcc.

6.Discusión

En el presente trabajo evaluamos la contribución de la corteza PL, el NAcc y su comunicación funcional en la regulación de la conducta bajo condiciones de conflicto donde los animales eligieron confrontar estímulos amenazantes para obtener recompensas. Primero, validamos farmacológicamente tres tareas de conflicto motivacional, implementadas en el laboratorio, mediante la administración sistémica de diazepam. Encontramos que, sin importar las propiedades innatas y/o aprendidas de las tareas, la inhibición sistémica del diazepam facilitó la confrontación de una amenaza para permitir la búsqueda de recompensas sin afectar la conducta en ausencia de conflicto. Este resultado nos permitió probar la validez farmacológica de nuestras tareas de conflicto para medir y manipular experimentalmente la conducta de elección ante la competencia de valencias motivacionales. Después, mediante inactivaciones farmacológicas temporales, probamos si la corteza PL y el NAcc de manera independiente contribuyen a la regulación de la conducta cuando se enfrentan condiciones de conflicto. Encontramos que la corteza PL y en aNAcc, pero no el pNAcc, son estructuras necesarias para que los animales retrasen la búsqueda de recompensas sólo cuando hay una amenaza presente. A diferencia de la manipulación con diazepam, a nivel cerebral encontramos una participación diferencial de las estructuras evaluadas de acuerdo con las características innatas y aprendidas de los estímulos para generar condiciones de conflicto. Por último, probamos si la comunicación de la corteza PL sobre el NAcc regula la búsqueda de recompensas cuando hay amenazas presentes. Encontramos que la fotoinhibición de la vía PL→NAcc facilita la conducta de elección de los animales para enfrentar una amenaza ante la disponibilidad de recompensas sólo durante el conflicto. En conjunto nuestros hallazgos sugieren que la corteza PL regula la conducta de ir o no ir por las recompensas cuando hay amenazas presentes en el ambiente a través de su correcta comunicación con el aNAcc.

6.1 Validación de las tareas de conflicto

6.1.1 Tareas de conflicto motivacional

Muchas de las tareas de conflicto previamente reportadas se han centrado en estudiar el conflicto desde la toma de decisiones entre diferentes opciones de recompensa (donde se debe elegir entre recompensas grandes y arriesgadas o recompensas pequeñas y seguras) y en el retraso y/o castigo de las recompensas (Anthony Burgos-Robles *et al.*, 2017a; Friedman *et al.*, 2015; Hamel *et al.*, 2017; Jean-Richard-Dit-Bressel & McNally, 2015; Orsini *et al.*, 2016; Piantadosi *et al.*, 2017; St. Onge & Floresco, 2010). Nuestras tareas de conflicto tienen la particularidad de que las ratas, con y sin entrenamiento, pueden distinguir entre regiones de peligro y de seguridad para ejecutar la conducta de elección más apropiada. En este sentido, las ratas pueden elegir quedarse en una región segura para evitar el estímulo aversivo o moverse a la zona de peligro para obtener recompensas. En todas nuestras tareas de conflicto las ratas respondieron confrontando las amenazas para obtener recompensas.

Una de las tareas de conflicto que desarrollamos involucra un entrenamiento extensivo para recompensar cruces riesgosos, otra tarea consiste en recompensar la conducta de descenso arriesgado y la última tarea implica comportamientos innatos en la búsqueda de recompensas riesgosas. En cada tarea, las condiciones de conflicto fueron manipuladas a distintos niveles (por ejemplo, se utilizaron diferentes estados motivacionales internos como el hambre o la sed) y con diferentes tipos de estímulos (tono, luz, contexto) para guiar la conducta (un resumen de las variables utilizadas en cada tarea de conflicto se muestra en la Tabla 1 del material suplementario). Otra característica importante de nuestras tareas es que en cada una se comparó la conducta de elección de las ratas en condiciones de conflicto y se aislaron los diferentes componentes motivacionales que las conforman. Así, los resultados encontrados con estas tareas de conflicto brindan una comprensión integral de cómo la manipulación farmacológica afectó el conflicto. Durante la validación de las tareas, demostramos que todas las elecciones de conflicto fueron sensibles al diazepam sin afectar la conducta en condiciones sin conflicto.

Discusión

Las tareas de conflicto que comparan condiciones de conflicto y no conflicto son escasas en la literatura. En cambio, todas nuestras tareas permiten comparar la conducta de elección ante la presencia y ausencia de conflicto. La comparación entre conflicto y no conflicto, así como el uso de señales aprendidas discretas nos permite aislar los efectos de las manipulaciones experimentales en las respuestas de conflicto y no conflicto en un mismo animal (ensayos de conflicto y no conflicto en una misma prueba) o en grupos independientes de ratas (prueba de conflicto y no conflicto en grupos separados de ratas).

Sólo dos tareas de conflicto motivacional que recientemente se han desarrollado (hasta donde sabemos) también comparan la conducta durante condiciones de conflicto y no conflicto. Una de estas tareas implica una prueba de un ensayo discreto en un laberinto radial en donde se evaluó la elección de las ratas para entrar en dos diferentes brazos: un brazo con señales visuales y táctiles que fueron asociadas con una contingencia aversiva y otra apetitiva y un brazo que no estuvo asociado a ninguna valencia motivacional (neutro) (Nguyen *et al.* 2015). A diferencia de este modelo conductual, nuestra tarea que involucra cruces de conflicto implica discriminar entre señales discretas y cronometradas en varios ensayos en ausencia y presencia de conflicto. Esto puede ser útil para registrar cambios en la actividad neuronal en el momento preciso en que los animales ejecutan una elección con respecto al momento en que deben suprimir las respuestas defensivas (o no) para obtener alimento. La segunda tarea que también contrasta condiciones de conflicto y no conflicto centra su atención en la conducta defensiva de congelamiento durante la presencia de recompensa (ensayos de conflicto) en comparación con ensayos neutros (sin conflicto) (Burgos-Robles *et al.*, 2017). En comparación con esta tarea, las nuestras se enfocan en la supresión activa (en lugar de pasiva) de las respuestas defensivas para obtener recompensas durante el conflicto. Esto es importante porque simula mejor los desafíos de la vida real con más facilidad que otras tareas (enfrentando amenazas impulsadas por el comportamiento de búsqueda de recompensas).

Por último, en contraste con los modelos de conflicto basados en depredadores (Choi and Kim 2010; Kimm and Choi 2018; Walters et al. 2019), el uso de señales condicionadas

discretas en nuestra tarea que involucra cruces de conflicto nos permite observar los momentos precisos de elección desencadenados por señales de amenaza y de recompensa. En conjunto nuestras tres tareas de conflicto, junto con los experimentos controles aquí presentados, permiten la separación de variables discretas que controlan el comportamiento en un entorno de competencia motivacional en un mismo individuo (*tarea de conflicto mediado cruces*) o en grupos independientes de ratas (*tarea de conflicto mediado por descenso y tarea de conflicto innato mediado por forrajeo*). Por tanto, nuestras tres tareas de conflicto representan una valiosa herramienta conductual para estudiar exhaustivamente los mecanismos cerebrales que permiten a los animales buscar recompensas a pesar de las amenazas.

6.1.2 El diazepam durante la competencia de motivaciones

Nuestros hallazgos de que el diazepam facilita la confrontación de amenazas para obtener recompensas, es consistente con la noción de que las benzodiazepinas reducen las respuestas defensivas relacionadas con la presencia de una amenaza durante el conflicto. Trabajos previos sobre el conflicto han demostrado que el diazepam incrementa: 1) el tiempo de permanencia en los brazos abiertos de un laberinto elevado (Chaouloff, Durand, and Mormède 1997; Dalvi and Rodgers 1999), 2) el tiempo de permanencia en el centro de un campo abierto que incluye comida (Britton and Britton 1981; Rex, Stephens, and Fink 1996) 3) el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado de una caja de evitación pasiva (Chaouloff, Durand, and Mormède 1997) 4) la conducta de forrajeo (Walters *et al.* 2019), 5) el número de recompensas castigadas que los animales toleran (Vogel, Beer, and Clody 1971; Paterson and Hanania 2010) y 6) decreta la supresión condicionada durante el conflicto (Commissaris and Rech 1982). Enfrentar una situación que es simultáneamente amenazadora y recompensante resulta en un aumento de la excitación fisiológica del organismo (*arousal*) (Barker, Buzzell, and Fox 2019), desencadenada por una señal de amenaza (Dreisbach and Fischer 2012) y que por ende genera ansiedad. En este sentido, nuestros resultados son consistentes con la noción de que el diazepam disminuye la incapacidad para buscar recompensas, probablemente reduciendo el

Discusión

aumento de la excitación del individuo asociada con la presencia de conflicto (efecto anti-conflicto). Algunos autores han teorizado que el efecto anti-conflicto del diazepam sobre la inhibición del comportamiento representa una manipulación directa sobre la ansiedad (Gray 1977).

Aunque el efecto anti-conflicto se ha interpretado también como un efecto ansiolítico (Liljequist and Engel 1984), en este estudio encontramos que una dosis baja de diazepam sólo afectó la conducta de elección durante el conflicto pero no modificó la conducta en ausencia de conflicto (incluido, la conducta de ansiedad, locomoción, coordinación motora, palanqueo por comida y reacciones pasivas de defensa como la inmovilización). Estos hallazgos son consistentes con la noción de que los comportamientos conflictivos son sensibles a los ansiolíticos, mientras que los comportamientos sin conflicto no lo son (McNaughton and Corr 2004). Es decir, las respuestas urgentes ante las amenazas provocan conductas defensivas que no responden a los ansiolíticos, mientras que las respuestas no urgentes a las amenazas provocan conductas de evaluación de riesgos que sí son sensibles a este tipo de drogas. Nuestro efecto con el diazepam sólo durante el conflicto sugiere que este fármaco reduce la probabilidad de involucrar estos comportamientos no urgentes relacionados con la presencia de la amenaza en competencia con las recompensas. Además, este efecto sobre las conductas conflictivas podría ser explicado también por una reducción de la ansiedad provocada por la anticipación de amenazas potenciales (ansiedad anticipatoria), sobre todo en aquellas que están relacionadas con la decisión urgente de enfrentar amenazas. En todas nuestras tareas de conflicto se induce un componente de ansiedad desencadenado por las opciones conflictivas que retan a los animales a decidir qué hacer y que fue reducido claramente con el diazepam. Por lo tanto, nuestros hallazgos apoyan la idea de que el diazepam puede tener un efecto anti-conflicto al reducir la ansiedad generada por situaciones de conflicto y demuestran que nuestras tareas son modelos conductuales sensibles para manipular la conducta de elección bajo opciones motivacionales en competencia.

6.2 Mecanismos cerebrales que participan en la regulación de la conducta durante situaciones de conflicto

6.2.1 La corteza prelímbica es necesaria para frenar la confrontación de una señal de amenaza durante la búsqueda de recompensas

El bloqueo temporal de la corteza PL disminuyó el tiempo que los animales tardaron en enfrentar una señal de amenaza para poder acercarse a una recompensa innata y aprendida (conflicto). Nuestros hallazgos son consistentes con otros trabajos de conflicto (enfocados en la supresión de la búsqueda de recompensas) que han reportado que el bloqueo de la actividad de esta estructura permite a los animales acercarse a recompensas a pesar del peligro (Limpens *et al.* 2015; Ventura *et al.* 2013; Orsini *et al.* 2018; Resstel, Souza, and Guimarães 2008; Lisboa *et al.* 2010). Sin embargo, a diferencia de lo que ya se ha reportado, nuestros resultados evidenciaron dos características importantes sobre la corteza PL: 1) que el efecto encontrado con la inactivación es exclusivo de la competencia de motivaciones opuestas (no afecta la conducta en condiciones sin conflicto), 2) esta estructura no es necesaria para la búsqueda de recompensas o para expresar reacciones de defensa ante una amenaza cuando las condiciones se presentan de manera aislada y 3) La corteza PL no es necesaria para responder ante condiciones de conflicto guiados por estímulos innatos en competencia.

Varios estudios han descrito que la corteza PL es necesaria para que un animal responda apropiadamente ante estímulos que señalizan amenazas (Sotres-Bayon and Quirk 2010a). Específicamente, se ha demostrado que la desactivación de la corteza PL disminuye el porcentaje de inmovilización de los animales durante la evocación del condicionamiento aversivo (Sierra-Mercado, Padilla-Coreano, and Quirk 2011b; Sotres-Bayon, Cain, and LeDoux 2006; Corcoran and Quirk 2007b; Bravo-Rivera *et al.* 2014). Sin embargo, nosotros no encontramos que la inactivación de la corteza PL afectara la respuesta de inmovilización durante el condicionamiento de amenaza.

Discusión

Una variable que podría explicar nuestros resultados es que, a diferencia de otros estudios, nuestro protocolo de condicionamiento al miedo (amenaza) no involucró la supresión de palanqueo como segunda medición de la memoria aversiva. Durante el condicionamiento de amenaza con palanqueo los animales deben dejar de presionar una palanca que entrega alimento para poder expresar reacciones pasivas de defensa, como la inmovilización, durante la señal que predice amenaza; lo cual simula condiciones de conflicto. Al inactivar la corteza PL en este tipo de condicionamiento al miedo encontramos una mejora en la búsqueda de recompensas a pesar del peligro. Lo cual, sugiere que en condiciones normales la corteza PL es necesaria para expresar adecuadamente reacciones de defensa ante una amenaza, pero sólo cuando estas recompensas compiten con una amenaza.

Consistente a lo anterior, también observamos que la inactivación de la corteza PL disminuyó el tiempo que tardaron los animales en acercarse a un estímulo naturalmente reforzante como la sacarina en un contexto amenazante sin afectar la conducta en condiciones sin conflicto o la propia ingesta de sacarina. Este resultado, también apoya lo encontrado con la prueba de conflicto que involucró señales condicionadas para guiar la conducta durante la competencia de motivaciones. En conjunto, nuestros datos sugieren que la corteza PL es necesaria para regular la conducta bajo condiciones de conflicto de dos maneras: 1) al permitir la expresión de reacciones de defensa pasivas y activas bajo el costo de perder amenazas y 2) al frenar la confrontación de una amenaza, mediante la expresión de reacciones de defensa, para ir en búsqueda de recompensas. Lo interesante de esta corteza es que puede regular la conducta de acuerdo con el tipo de conflicto motivacional que se le presente, en donde los animales pueden elegir perder las recompensas disponibles o sólo retrasar la búsqueda de las mismas ante la presencia de amenazas.

Por último, la corteza PL no es necesaria para regular la conducta de forrajeo ante escenarios de amenazas innatas. Este resultado es congruente con la literatura ya que se ha descrito que esta estructura no es necesaria para responder ante estímulos que de manera natural (innata) generan respuestas aversivas o apetitivas (De la Cruz, Coke, and Bodnar 2016;

Corcoran and Quirk 2007a). Esto es importante porque sugiere que los mecanismos cerebrales que subyacen a la conducta bajo conflicto dependen más de las propiedades individuales de los estímulos para generar respuestas opuestas que por el simple hecho de que se presenten en competencia. En este sentido, es probable que la regulación de la conducta para enfrentar amenazas innatas durante el forrajeo se lleve a cabo por otras estructuras subcorticales que se sabe procesan información aversiva o apetitiva de estímulos innatos como el ATV (Cardinal, Parkinson, Hall, *et al.* 2002), la materia gris periacueductual (GPA) (Watson *et al.* 2016), o el NAcc como se observó en este trabajo.

6.2.2 El Núcleo Accumbens anterior es necesario para frenar la confrontación de una amenaza, aprendida o innata, cuando compite con la búsqueda de recompensas

El bloqueo temporal de la actividad del aNAcc facilitó la búsqueda de recompensas a pesar de la presencia de una amenaza, sin afectar la conducta en condiciones sin conflicto, en las tres tareas de conflicto evaluadas. Este dato es congruente con otro estudio publicado por Piantadosi y colaboradores (2017) en donde observaron que la inactivación del NAcc incrementó la respuesta de palanqueo por comida a pesar de ser castigada con una descarga eléctrica (Piantadosi *et al.* 2017). Sin embargo, en el estudio citado se encontró que la parte *Shell*, pero no la parte *Core* fue importante para responder durante el conflicto motivacional. En contraste, nosotros realizamos todas nuestras manipulaciones dirigidas hacia la parte *Core* del aNAcc debido a que encontramos que la desactivación de la parte *Shell* de esta estructura no es necesaria para responder ante condiciones de conflicto. Otra diferencia importante de nuestro trabajo con los resultados descritos por Piantadosi y colaboradores (2017) es que nuestras tareas de conflicto involucran el enfrentamiento de una amenaza por recompensa a diferencia del artículo citado donde los animales preferentemente evitan ir por la recompensa antes de la desactivación del NAcc *Shell*. A pesar de la localización específica de las

Discusión

inactivaciones del NAcc y del diseño de la tarea, nuestros resultados son compatibles con la idea de que el NAcc es necesario para responder ante la presencia de estímulos en competencia.

Por otra parte, nuestros resultados observados de manera diferencial de acuerdo al eje anteroposterior del NAcc *Core* y las pruebas de conflicto son menos congruentes con la poca literatura que ha abordado estas condiciones. Por ejemplo, un estudio reciente describió que la desactivación de pNAcc, pero no el anterior, incrementó la respuesta de evitación de los animales para entrar a un brazo de un laberinto donde dos señales contextuales indicaban la presencia simultánea de recompensa y una descarga eléctrica (Hamel et al. 2017). En contraste, nosotros observamos que la desactivación del aNAcc, pero no el pNAcc, facilitó la elección de los animales por acercarse a una recompensa a pesar de la presencia de una señal que predecía la descarga eléctrica.

Las diferencias observadas entre el estudio publicado por Hamel y colaboradores (2017) y nuestros resultados pueden deberse a diversas variables, tales como: 1) las coordenadas utilizadas en el artículo citado para definir aNAcc y pNAcc son diferentes de las que nosotros utilizamos en este trabajo, 2) el tipo de estímulos utilizados para generar condiciones de conflicto difieren en tiempo de presentación y modalidad sensorial. Nosotros utilizamos señales discretas auditivas y visuales mientras que en el artículo citado utilizaron señales contextuales para guiar la conducta. Esto es importante porque de acuerdo con el tipo de señal utilizada, el NAcc podría requerir comunicarse con otras estructuras cerebrales relacionadas con el contexto como el hipocampo o la amígdala para las señales auditivas (Floresco, 2015) y 3) en el artículo citado también observaron que la desactivación del pNAcc incrementó las respuesta de evitación de los animales en condiciones sin conflicto por lo que, el efecto observado durante la prueba de conflicto puede deberse a un incremento de las respuestas defensivas de los animales ante la señal que predecía peligro. A diferencia de nuestros resultados que fueron específicos de condiciones de conflicto sin alterar la respuesta defensiva de los animales ante la presencia de una señal de amenaza. En conjunto, podemos mencionar que la participación del NAcc para responder ante condiciones de conflicto es más

Discusión

difícil de generalizar e interpretar de acuerdo a su eje anteroposterior con lo poco que se ha descrito en la literatura. Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados encontrados en este trabajo, podemos inferir que la parte anterior, pero no la posterior, de esta estructura es necesaria para enfrentar amenazas ante la búsqueda de recompensas y que esta participación del aNAcc fue generalizable en nuestras tres tareas de conflicto motivacional.

Por otra parte, nuestros datos también revelaron que el aNAcc no es necesario para que los animales respondan de manera pasiva ante la presencia de una amenaza, para la búsqueda de recompensas o para la ingesta de alimento evaluadas de manera independiente. Resultados que también difieren con algunos estudios donde sí han encontrado diferencias al bloquear la actividad del aNAcc durante la ingesta de alimento (Reynolds and Berridge, 2001) o al realizar tareas que requieren de la expresión de respuestas activas de defensa ante estímulos que predicen amenazas (Bravo-Rivera *et al.* 2014; Fernando *et al.* 2014). Sin embargo, en ambos estudios la inactivación del aNAcc estuvo dirigida más a la parte *Shell* de esta estructura, mientras que nosotros nos dirigimos más a la parte *Core*. Además, nosotros evaluamos una respuesta defensiva de tipo pasiva (inmovilización) y no una de tipo activa (evitación) como lo hicieron Fernando y colaboradores (2014). Esto podría significar que existe una diferenciación del NAcc *Core* y *Shell* para generar respuestas pasivas o activas de defensa lo cual, hasta donde sabemos, no se ha evaluado.

Por otro lado, al igual que en la corteza PL, corroboramos que el efecto observado con la desactivación del aNAcc se debiera sólo a condiciones de conflicto y evaluamos la participación de esta estructura en el condicionamiento de amenaza con palanqueo. Encontramos que los animales con la actividad del aNAcc bloqueada decrementaron su respuesta de inmovilización ante la señal aversiva e incrementaron la búsqueda de recompensas. Este resultado, al igual que lo encontrado con la corteza PL, sugieren que ambas estructuras participan en la generación de reacciones de defensas pasivas de los animales sólo cuando hay recompensas disponibles.

Discusión

Por último, encontramos que el aNAcc también es necesario para enfrentar amenazas tanto innatas como señalizadas para ir en búsqueda de recompensas o forrajear por comida. Esto es consistente con la literatura donde se ha demostrado que las neuronas del NAcc pueden procesar estímulos que generan naturalmente respuestas aversivas y apetitivas así como también ajustar su actividad para responder ante estímulos condicionados opuestos (Setlow, Schoenbaum, and Gallagher 2003; Roitman, Wheeler, and Carelli 2005). Nuestros resultados demuestran que el aNAcc no sólo codifica ambos tipos de estímulos, sino que además es capaz de utilizar esa información y permitir respuestas conductuales apropiadas ante la presencia de conflictos motivacionales sin importar las características aprendidas o innatas de los estímulos en competencia. Este dato es muy parecido a lo encontrado con la administración sistémica de diazepam. Lo cual, podría indicar que el NAcc regula la conducta de conflicto sin importar la naturaleza de los estímulos para generar respuestas aprendidas o innatas.

En conjunto, nuestros datos sugieren que el aNAcc, al igual que la corteza PL, es necesario para regular la conducta bajo condiciones de conflicto de dos maneras: 1) al permitir la expresión de reacciones de defensa pasivas y activas bajo el costo de perder amenazas y 2) al frenar la confrontación de una amenaza, mediante la expresión de reacciones de defensa, para ir en búsqueda de recompensas.

6.2.3 El Núcleo Accumbens posterior es necesario para la búsqueda de recompensas que involucran la ejecución de respuestas instrumentales ante condiciones de conflicto y no conflicto aprendido

Durante la desactivación del pNAcc en la tarea de cruces de conflicto observamos un incremento en el tiempo que tardaron los animales para acercarse a la recompensa señalizada en ensayos de conflicto como de no conflicto. Realizamos varios experimentos control para saber si el efecto observado se debió a un impedimento en la respuesta motivacional aversiva o apetitiva, o una alteración de la conducta motora.

Discusión

Encontramos que la inactivación del pNAcc no afectó la distancia que recorrieron los animales en un campo abierto ni el tiempo en terminar de recorrer la viga elevada, sugiriendo que esta estructura no es necesaria para la locomoción o coordinación motora. Lo cual, es congruente con lo que ya se ha reportado en la literatura (Bravo-Rivera *et al.* 2014). Tampoco encontramos que la inactivación del pNAcc afectó la expresión de reacciones de defensa pasivas ante la presencia de un estímulo que señalizó amenaza. A diferencia de otros estudios que han reportado que la parte posterior de esta estructura es necesaria para expresar conductas de evitación y de enterramiento defensivo ante la presencia de estímulos negativos (Hamel *et al.* 2017; Reynolds and Berridge 2001).

Algunos estudios han demostrado que al interrumpir de manera temporal la actividad del NAcc los animales son incapaces de acercarse a una señal que predice la disponibilidad de recompensas (*autoshaping*) (Atallah *et al.* 2007). Nosotros encontramos que al desactivar el pNAcc hubo un impedimento significativo para ejecutar la respuesta instrumental de palanqueo, sin afectar la conducta de ingesta de alimento de los animales. Este resultado es congruente con otros estudios donde se ha observado que las lesiones específicas del NAcc Core y la depleción de la actividad dopaminérgica de esta estructura disminuyen drásticamente la respuesta de palanqueo sin alterar el consumo de alimento (Sokolowski and Salamone 1998; Balleine and Killcross 1994). Sin embargo, otros estudios han demostrado que lesionar el NAcc o inactivar temporalmente esta estructura sólo afecta la respuesta instrumental de palanqueo cuando existe un retraso en la entrega de la recompensa (Cardinal and Cheung 2005) o durante la adquisición de la respuesta instrumental pero no durante su evocación (Chang, *et al.*, 2012). Por lo que, aún no es claro en la literatura cómo el NAcc participa en la ejecución de respuestas instrumentales ante la presencia de recompensas, ni mucho menos si existe una participación diferencial de esta estructura de acuerdo a su eje anteroposterior. Hasta donde hemos revisado, este es el primer estudio que reporta efectos diferenciales en la parte anterior y posterior del NAcc durante la ejecución de respuestas instrumentales.

Discusión

Por último, encontramos que el NAcc posterior no es necesario para buscar recompensas innatas en un contexto amenazante o ante la presencia de un estímulo naturalmente aversivo, de acuerdo con lo observado durante la *tarea de conflicto mediado por descenso* o la *tarea de conflicto innato mediado por forrajeo*. Este resultado apoyaría más la idea de que la parte posterior de esta estructura está encargada de la ejecución de respuestas instrumentales y que por ende no tiene un papel importante en las tareas de conflicto que no involucran la realización de conductas operantes para ser resueltos.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que, el pNAcc es necesario para ejecutar correctamente una respuesta instrumental (palanqueo o aproximación) ante una señal que predice la disponibilidad de recompensas con o en ausencia de la presencia de señal que predice amenazas. Mientras que, el aNAcc, al igual que la corteza PL, es necesario para retrasar la búsqueda de recompensas sólo cuando éstas compiten con la presencia de una señal que predice amenazas. Esto sugiere que la regulación de la conducta para enfrentar amenazas durante el conflicto podría depender de la comunicación entre la corteza PL y aNAcc.

6.2.4 La corteza Prelímbica regula el acto de enfrentar amenazas para obtener recompensas a través de su comunicación con el Núcleo Accumbens

Debido a que encontramos que la corteza PL y el aNAcc son necesarios para frenar la búsqueda de recompensas ante la presencia de amenazas, nos preguntamos si la comunicación entre ambas estructuras es necesaria para regular la conducta durante condiciones de conflicto. Diversos estudios han demostrado que la corteza PL envía proyecciones glutamatérgicas de manera preferente al NAcc *Core* en comparación con el NAcc *Shell* (Vertes 2004). Interesantemente, un estudio reportó que la proyección glutamatérgica de la corteza PL suele ser más densa hacia las zonas anteriores del NAcc *Core* (Gorelova and Yang 1996) sin embargo, aún no hay un consenso claro sobre esta diferenciación. Nosotros, dirigimos muestras férulas de estimulación hacia el aNAcc *Core* por ser el sitio donde observamos los efectos conductuales con la inactivación de esta estructura.

Discusión

Encontramos que la fotoinhibición de la vía PL→NAcc facilitó la búsqueda de recompensas a pesar de la presencia de una amenaza, sin afectar la conducta en ausencia de conflicto, la expresión de reacciones pasivas de defensa ante una señal de amenaza o la búsqueda de recompensas evaluadas de manera independiente. Estudios recientes han demostrado la participación de la corteza PL y su comunicación con diferentes estructuras subcorticales como el NAcc para permitir la conducta de aproximación-avoidancia ante estímulos opuestos. De manera general, se ha observado que la fotoinhibición de la vía PL→NAcc es necesaria para promover la búsqueda de recompensas artificiales como la cocaína (Stefanik, Kupchik, and Kalivas 2016). En contra parte, la estimulación de la vía PL→NAcc impide la expresión de reacciones activas de defensa como la evitación ante la presencia de amenaza (Diehl *et al.* 2020). En el ámbito del conflicto, un estudio publicado por Friedman y colaboradores (2015) encontró que la fotoinhibición de la vía CPFm→EV (del que forma parte el NAcc) incrementó la preferencia de los animales para elegir grandes recompensas bajo el costo de enfrentar una amenaza, mientras que su fotoinhibición disminuyó esta conducta de elección (Friedman *et al.* 2015). Esto sugiere que, la vía CPFm→EV es necesaria y suficiente para que los animales respondan ante la presencia de conflicto.

A diferencia del estudio citado previamente, nosotros encontramos que la fotoinhibición de los axones de la corteza PL en el aNAcc mejoró la búsqueda de recompensas a pesar de la presencia de una señal de amenaza. Este resultado fue congruente con lo observado de manera independiente con las inactivaciones en la corteza PL y aNAcc durante las pruebas de conflicto. Por lo que, nuestros datos sugieren que en condiciones normales la corteza PL a través de su comunicación con el aNAcc frena la conducta de elección para confrontar una amenaza señalizada por las recompensas.

La regulación de la CPFm sobre la conducta a través de su comunicación con estructuras río abajo se ha sugerido y estudiado bastante (Pastor and Medina 2021), incluso ante la presencia de conflictos. Por ejemplo, se ha reportado que la vía PL→NAcc *Shell* participa en la supresión de búsqueda de recompensas cuando una señal aversiva se presenta

Discusión

simultáneamente (Piantadosi, Yeates, and Floresco 2020). Mientras que, la vía IL→Amígdala es necesaria para que los animales supriman la búsqueda de recompensa cuando se les castiga con una descarga eléctrica (Ishikawa *et al.* 2020). Otros estudios han identificado la participación de la CPFm en la regulación de diferentes conductas relacionadas con la presencia de recompensas o estímulos aversivos a través de su diferente comunicación con estructuras como la habénula, el ATV, el AGP e incluso el cerebelo (Para una revisión consisa sobre el tema revisar Pastor & Medina, 2021).

Nosotros encontramos que la corteza PL y su comunicación con el NAcc no sólo regula la supresión de conductas apetitivas ante la presencia de amenazas, si no que esta estructura tiene la capacidad de retrasar o “frenar” la búsqueda de recompensas cuando se presenta en competencia con un estímulo que indica o predice amenaza. Una explicación de como ocurre este proceso se encuentra en la **figura 20A**. Al inicio, la información de los estímulos llegan a la amígdala, a través de su comunicación directa con el tálamo (Phelps and LeDoux 2005) (después de pasar por varios relevos sensoriales). En la amígdala los estímulos adquieren un valor positivo o negativo de acuerdo con las contingencias con que fueron asociadas (Beyeler *et al.* 2018). Mediante la comunicación (recíproca) de la amígdala con la CPFm, la información del valor de los estímulos converge en la corteza PL donde son interpretados como estímulos de amenaza o de recompensa. La información de la valencia de los estímulos también puede llegar a la corteza PL mediante otras áreas como el ATV, el NAcc (de manera indirecta), la habénula, etc. (Pastor and Medina 2021; Moorman *et al.* 2015). Una vez que la información referente al valor de los estímulos converge en la corteza PL, ésta se comunica con el aNAcc a través de su proyección excitatoria, para regular la ejecución de respuestas apropiadas al conflicto. El aNAcc, de manera directa o indirecta con el PV, se comunica con estructuras relacionadas con la motricidad (Moorman *et al.* 2015) para frenar la confrontación de una amenaza señalizada ante la presencia de recompensas en competencia. Lo cual, se vio reflejado por un incremento en las latencias de cruces durante los ensayos de conflicto. Sin embargo, la fotoinhibición de la comunicación de la corteza PL con el aNAcc acelera la búsqueda de

Discusión

recompensas a pesar de la presencia de amenaza (**Figura 20B**), reflejado por un decremento en el tiempo que tardaron los animales en cruzar por la comida durante el conflicto.

Queda por explorar otras posibles vías de comunicación de la corteza PL con otras estructuras subcorticales durante el conflicto. Por ejemplo, una posible vía funcional en este fenómeno podría ser la comunicación de la corteza PL con la amígdala. Recientemente en el laboratorio se encontró que la inactivación de la amígdala durante la *prueba de conflicto mediada por cruces* decrementó significativamente las latencias de cruces sólo durante ensayos de conflicto (Hernandez-Jaramillo A., and Sotres-Bayon 2018). La inhibición de la vía PL→Amígdala podría mejorar también la confrontación de amenazas durante la presencia de conflicto al afectar de manera directa la expresión de reacciones de defensa ante una señal de amenaza, como ya se ha visto en otros trabajos (Sotres-Bayon *et al.* 2012). Así mismo, otra vía importante a evaluar podría ser la comunicación de la amígdala con el NAcc para regular la conducta durante condiciones de conflicto. Recientemente un estudio reportó que esta vía Amígdala→NAcc es necesaria para que los animales eviten una descarga eléctrica (Diehl *et al.*, 2020). Esta vía podría ser importante para regular la confrontación de amenazas innatas para mejorar la conducta de forrajeo.

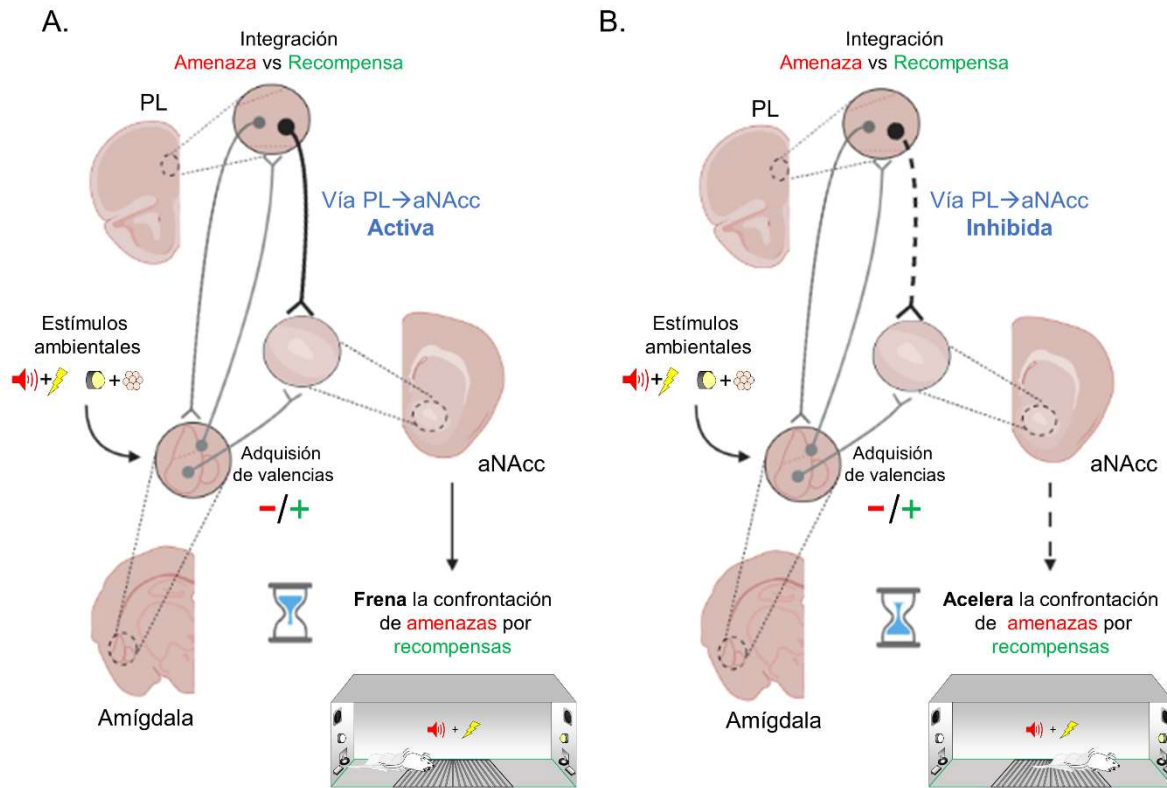


Figura 20. Circuito cerebral para regular el acto de confrontar amenazas en búsqueda de recompensas. **A,** En condiciones normales los estímulos ambientales adquieren su valor positivo o negativo (-/+ en la amígdala basolateral (tono + descarga eléctrica, luz +comida). Está información converge en la corteza PL, a través de su comunicación recíproca con la amígdala, para ser integrada y procesada como estímulos de amenaza vs estímulos de recompensa durante el conflicto. Una vez integrada la información en la corteza PL, ésta se comunica de manera excitatoria con el aNAcc (vía activa) para frenar la búsqueda de recompensas ante la presencia de una amenaza potencial. Esto se ve reflejado en un mayor tiempo requerido para cruzar por la comida durante el conflicto. **B,** Fotoinhibición de la vía PL→NAcc, la valencia de los estímulos (-/+) es adquirida en la Amígdala de manera normal para después ser enviada a la corteza PL. Al ser interrumpida la comunicación de la corteza PL con el aNAcc (vía inhibida) se quita el freno conductual para enfrentar amenazas y se observa una aceleración de la búsqueda de recompensas a pesar de la presencia de una amenaza.

7. Conclusión

Los datos presentados en este trabajo sugieren que la corteza PL y el aNAcc contribuyen a la regulación de la conducta bajo condiciones de conflicto que requieren el enfrentamiento activo de amenazas para conseguir recompensas. La corteza PL regula la respuesta ante conflictos conformados por la presencia de amenazas señalizadas en competencia con recompensas aprendidas e innatas, mientras que el aNAcc regula la conducta en conflictos que son guiados por la competencia de estímulos innatos y aprendidos. Por su parte el pNAcc no regula la conducta bajo conflicto motivacional pero sí permite la correcta ejecución de respuestas instrumentales para obtener recompensas. El control central de la respuesta ante condiciones de conflicto, guiados por estímulos condicionados, está regulado por la comunicación funcional de la corteza PL y el aNAcc. Donde la corteza PL ejerce un control sobre la actividad del aNAcc para permitir un freno conductual al momento de confrontar una amenaza para ir en búsqueda de recompensas.

Bibliografia

- Albrechet-Souza, Lucas, Karina G. Borelli, and Marcus L. Brandão. 2008. "Activity of the Medial Prefrontal Cortex and Amygdala Underlies One-Trial Tolerance of Rats in the Elevated plus-Maze." *Journal of Neuroscience Methods* 169 (1): 109–18. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.11.025>.
- Atallah, Hisham E., Dan Lopez-Paniagua, Jerry W. Rudy, and Randall C. O'Reilly. 2007. "Separate Neural Substrates for Skill Learning and Performance in the Ventral and Dorsal Striatum." *Nature Neuroscience* 10 (1): 126–31. <https://doi.org/10.1038/nn1817>.
- Aupperle, Robin L., and Martin P. Paulus. 2010. "Neural Systems Underlying Approach and Avoidance in Anxiety Disorders." *Dialogues in Clinical Neuroscience* 12 (4): 517–31. <https://doi.org/10.31887/dcns.2010.12.4/raupperle>.
- Baeg, Eun Ha, Yun Bok Kim, Jinhwa Jang, Hyun Taek Kim, Inhee Mook-Jung, and Min Whan Jung. 2001. "Fast Spiking and Regular Spiking Neural Correlates of Fear Conditioning in the Medial Prefrontal Cortex of the Rat." *Cerebral Cortex* 11 (5): 441–51. <https://doi.org/10.1093/cercor/11.5.441>.
- Bailey, Clark J., and Neal E. Miller. 1952. "The Effect of Sodium Amytal on an Approach-Avoidance Conflict in Cats." *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 45 (3): 205–8. <https://doi.org/10.1037/h0055258>.
- Balleine, Bernard, and Simon Killcross. 1994. "Effects of Ibotenic Acid Lesions of the Nucleus Accumbens on Instrumental Action." *Behavioural Brain Research* 65 (2): 181–93. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90104-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90104-X).
- Barker, Tyson V., George A. Buzzell, and Nathan A. Fox. 2019. "Approach, Avoidance, and the Detection of Conflict in the Development of Behavioral Inhibition." *New Ideas in Psychology* 53 (March): 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.newideapsych.2018.07.001>.
- Beyeler, Anna, Chia Jung Chang, Margaux Silvestre, Clémentine Lévêque, Praneeth Namburi, Craig P. Wildes, and Kay M. Tye. 2018. "Organization of Valence-Encoding and Projection-Defined Neurons in the Basolateral Amygdala." *Cell Reports* 22 (4): 905–18. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.097>.
- Boyden, Edward S. 2011. "A History of Optogenetics: The Development of Tools for Controlling Brain Circuits with Light." *1000 Biology Reports* 3 (1): 1–12. <https://doi.org/10.3410/B3-11>.
- Bravo-Rivera, Christian, Ciorana Roman-Ortiz, Edith Brignoni-Perez, Francisco Sotres-Bayon, and Gregory J Quirk. 2014. "Behavioral/Cognitive Neural Structures Mediating Expression and Extinction of Platform-Mediated Avoidance." <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0191-14.2014>.

Bibliografía

- Bravo-Rivera, Christian, Ciorana Roman-Ortiz, Marlian Montesinos-Cartagena, and Gregory J. Quirk. 2015. "Persistent Active Avoidance Correlates with Activity in Prelimbic Cortex and Ventral Striatum." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 9 (JULY): 1-8. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00184>.
- Britton, Donald R., and Karen Thatcher Britton. 1981. "A Sensitive Open Field Measure of Anxiolytic Drug Activity." *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 15 (4): 577-82. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(81\)90212-4](https://doi.org/10.1016/0091-3057(81)90212-4).
- Burgos-Robles, A, H Bravo-Rivera, and G J Quirk. 2013. "Prelimbic and Infralimbic Neurons Signal Distinct Aspects of Appetitive Instrumental Behavior." *PLoS ONE* 8 (2): 57575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057575>.
- Burgos-Robles, Anthony, Eyal Y Kimchi, Ehsan M Izadmehr, Mary Jane Porzenheim, William A Ramos-Guasp, Edward H Nieh, Ada C Felix-Ortiz, et al. 2017b. "Amygdala Inputs to Prefrontal Cortex Guide Behavior amid Conflicting Cues of Reward and Punishment" 8 (2). <https://doi.org/10.1038/nn.4553>.
- Burgos-Robles, Anthony, Ivan Vidal-Gonzalez, and Gregory J Quirk. 2009. "Sustained Conditioned Responses in Prelimbic Prefrontal Neurons Are Correlated with Fear Expression and Extinction Failure." *Journal of Neuroscience* 29 (26): 8474-8482. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0378-09.2009>.
- Cardinal, Rudolf N., and Timothy H.C. Cheung. 2005. "Nucleus Accumbens Core Lesions Retard Instrumental Learning and Performance with Delayed Reinforcement in the Rat." *BMC Neuroscience* 6: 1-23. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-6-9>.
- Cardinal, Rudolf N., John A. Parkinson, Jeremy Hall, and Barry J. Everitt. 2002. "Emotion and Motivation: The Role of the Amygdala, Ventral Striatum, and Prefrontal Cortex." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 26 (3): 321-52. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(02\)00007-6](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(02)00007-6).
- Cardinal, Rudolf N., John A. Parkinson, Guillaume Lachenal, Katherine M. Halkerston, Nung Rudarakanchana, Jeremy Hall, Caroline H. Morrison, Simon R. Howes, Trevor W. Robbins, and Barry J. Everitt. 2002. "Effects of Selective Excitotoxic Lesions of the Nucleus Accumbens Core, Anterior Cingulate Cortex, and Central Nucleus of the Amygdala on Autoshaping Performance in Rats." *Behavioral Neuroscience* 116 (4): 553-67. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.116.4.553>.
- Carlén, Marie. 2017. "What Constitutes the Prefrontal Cortex?" *Science* 358 (6362): 478-82. <https://doi.org/10.1126/science.aan8868>.
- Chang, S. E., Wheeler, D. S., & Holland, P. C. 2012. "Roles of Nucleus Accumbens and Basolateral Amygdala in Autoshaped Lever Pressing." *Neurobiology of Learning and Memory* 97 (4) (1): 441-51. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.03.008>.Roles.

Bibliografia

- Chaouloff, F., M. Durand, and P. Mormède. 1997. "Anxiety- and Activity-Related Effects of Diazepam and Chlordiazepoxide in the Rat Light/Dark and Dark/Light Tests." *Behavioural Brain Research* 85 (1): 27-35. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(96\)00160-X](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(96)00160-X).
- Choi, June Seek, and Jeansok J. Kim. 2010. "Amygdala Regulates Risk of Predation in Rats Foraging in a Dynamic Fear Environment." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (50): 21773-77. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010079108>.
- Commissaris, R. L., and R. H. Rech. 1982. "Interactions of Metergoline with Diazepam, Quipazine, and Hallucinogenic Drugs on a Conflict Behavior in the Rat." *Psychopharmacology* 76 (3): 282-85. <https://doi.org/10.1007/BF00432562>.
- Corcoran, Kevin A, and Gregory J Quirk. 2007a. "Activity in Prelimbic Cortex Is Necessary for the Expression of Learned, But Not Innate, Fears." *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5327-06.2007>.
- Corr, Philip J. 2013. "Approach and Avoidance Behaviour: Multiple Systems and Their Interactions." *Emotion Review* 5 (3): 285-90. <https://doi.org/10.1177/1754073913477507>.
- Courtin, J., T. C.M. Bienvenu, E. Ö Einarsson, and C. Herry. 2013. "Medial Prefrontal Cortex Neuronal Circuits in Fear Behavior." *Neuroscience* 240 (March): 219-42. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.03.001>.
- Dalvi, A., and R. J. Rodgers. 1999. "Behavioral Effects of Diazepam in the Murine Plus-Maze: Flumazenil Antagonism of Enhanced Head Dipping but Not the Disinhibition of Open-Arm Avoidance." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 62 (4): 727-34. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(98\)00220-2](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(98)00220-2).
- DeFelipe, Javier, Lidia Alonso-Nanclares, and Jon I. Arellano. 2002. "Microstructure of the Neocortex: Comparative Aspects." *Journal of Neurocytology* 31 (3-5 SPEC. ISS.): 299-316. <https://doi.org/10.1023/A:1024130211265>.
- Dégenétais, E., A. M. Thierry, J. Glowinski, and Y. Gioanni. 2002. "Electrophysiological Properties of Pyramidal Neurons in the Rat Prefrontal Cortex: An in Vivo Intracellular Recording Study." *Cerebral Cortex* 12 (1): 1-16. <https://doi.org/10.1093/cercor/12.1.1>.
- Deisseroth, Karl. 2015. "Optogenetics: 10 Years of Microbial Opsins in Neuroscience." *Nature Neuroscience* 18 (9): 1213-25. <https://doi.org/10.1038/nn.4091>.
- Diehl, Maria M., Christian Bravo-Rivera, and Gregory J. Quirk. 2019. "The Study of Active Avoidance: A Platform for Discussion." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 107: 229-37. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.09.010>.

Bibliografía

- Diehl, Maria M., Jorge M. Iravedra-Garcia, Jonathan Morán-Sierra, Gabriel Rojas-Bowe, Fabiola N. Gonzalez-Diaz, Viviana P. Valentín-Valentín, and Gregory J. Quirk. 2020. "Divergent Projections of the Prelimbic Cortex Bidirectionally Regulate Active Avoidance." *ELife* 9: 1–13. <https://doi.org/10.7554/eLife.59281>.
- Dreisbach, Gesine, and Rico Fischer. 2012. "Conflicts as Aversive Signals." *Brain and Cognition* 78 (2): 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2011.12.003>.
- Eichenbaum, Howard. 2017a. "Prefrontal-Hippocampal Interactions in Episodic Memory." *Nature Reviews Neuroscience* 18 (9): 547–58. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.74>.
- Estes, W. K., and B. F. Skinner. 1941. "Some Quantitative Properties of Anxiety." *Journal of Experimental Psychology* 29 (5): 390–400. <https://doi.org/10.1037/hoo62283>.
- Feja, Malte, Linda Hayn, and Michael Koch. 2014. "Nucleus Accumbens Core and Shell Inactivation Differentially Affects Impulsive Behaviours in Rats." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 54: 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.04.012>.
- Fenno, Lief, Ofer Yizhar, and Karl Deisseroth. 2011. "The Development and Application of Optogenetics." *Annual Review of Neuroscience* 34: 389–412. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113817>.
- Fernando, A. B., Urcelay, G. P., Mar, A. C., Dickinson, A., & Robbins, T. W. 2014. "Safety Signals as Instrumental Reinforcers during Free-Operant Avoidance." *Learning and Memory* 21 (9): 488–97. <https://doi.org/10.1101/lm.034603.114>.
- Fernando, Anushka Bp, Gonzalo P Urcelay, Adam C Mar, Tony A Dickinson, and Trevor W Robbins. 2014. "The Role of the Nucleus Accumbens Shell in the Mediation of the Reinforcing Properties of a Safety Signal in Free-Operant Avoidance: Dopamine-Dependent Inhibitory Effects of d-Amphetamine." *Neuropsychopharmacology* 39: 1420–30. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.337>.
- Fields, Howard L., Gregory O. Hjelmstad, Elyssa B. Margolis, and Saleem M. Nicola. 2007. "Ventral Tegmental Area Neurons in Learned Appetitive Behavior and Positive Reinforcement." *Annual Review of Neuroscience* 30: 289–316. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094341>.
- Floresco, Stan B. 2015. "The Nucleus Accumbens: An Interface between Cognition, Emotion, and Action." *Annual Review of Psychology* 66 (September 2014): 25–32. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010213-115159>.
- Friedman, Alexander, Daigo Homma, Leif G. Gibb, Ken Ichi Amemori, Samuel J. Rubin, Adam S. Hood, Michael H. Riad, and Ann M. Graybiel. 2015. "A Corticostriatal Path Targeting Striosomes Controls Decision-Making under Conflict." *Cell* 161 (6): 1320–33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.049>.

Bibliografia

- Geller, Irving, and Joseph Seifter. 1960. "The Effects of Meprobamate, Barbiturates, d-Amphetamine and Promazine on Experimentally Induced Conflict in the Rat." *Psychopharmacologia* 1 (6): 482-92. <https://doi.org/10.1007/BF00429273>.
- Giustino TF and Maren S. 2015. "The Role of the Medial Prefrontal Cortex in the Conditioning and Extinction of Fear." <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00298>.
- Goldstein, L. B., & Davis, J. N. 1990. "Post-Lesion Practice and Amphetamine-Facilitated Recovery of Beam-Walking in the Rat." *Restorative Neurology and Neuroscience* 1(5): 311-314.
- Gorelova, N., and C. R. Yang. 1996. "The Course of Neural Projection from the Prefrontal Cortex to the Nucleus Accumbens in the Rat." *Neuroscience* 76 (3): 689-706. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00380-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00380-6).
- Gray, Jeffrey A. 1977. "Drug Effects on Fear and Frustration: Possible Limbic Site of Action of Minor Tranquilizers." *Drugs, Neurotransmitters, and Behavior*, 433-529. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3180-3_10.
- Hamel, Laurie, Tharshika Thangarasa, Osai Samadi, and Rutsuko Ito. 2017. "Caudal Nucleus Accumbens Core Is Critical in the Regulation of Cue-Elicited Approach-Avoidance Decisions." *ENeuro* 4 (1): 1-14. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0330-16.2017>.
- Hamill, S., J. T. Trevitt, K. L. Nowend, B. B. Carlson, and J. D. Salamone. 1999. "Nucleus Accumbens Dopamine Depletions and Time-Constrained Progressive Ratio Performance: Effects of Different Ratio Requirements." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 64 (1): 21-27. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(99\)00092-1](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(99)00092-1).
- Han, Ying, and Lin Lu. 2016. "The Other Face of the Nucleus Accumbens: Aversion." *Neuroscience Bulletin* 32 (6): 569-71. <https://doi.org/10.1007/s12264-016-0051-8>.
- Hernandez-Jaramillo A., and Sotres-Bayon, F. 2018. "Basolateral Amygdala, but Not the Orbitofrontal Cortex, Is Necessary for Motivational Conflict Responses Guided by Previous." In *Society for Neuroscience*. San Diego, CA.
- Hu, Hailan. 2016. "Reward and Aversion." *Annual Review of Neuroscience* 39: 297-324. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070815-014106>.
- Ishikawa, Junko, Yoshio Sakurai, Akinori Ishikawa, and Dai Mitsushima. 2020. "Contribution of the Prefrontal Cortex and Basolateral Amygdala to Behavioral Decision-Making under Reward/Punishment Conflict." *Psychopharmacology* 237 (3): 639-54. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05398-7>.
- Izquierdo I, Quillfeldt JA, Zanatta MS, Quevedo J, Schaeffer E, Schmitz PK, Medina JH. 1997. "Sequential Role of Hippocampus and Amygdala, Entorhinal Cortex and Parietal Cortex in Formation and Retrieval of Memory for Inhibitory Avoidance in Rats." *Eur J Neurosci*.

Bibliografia

- 9 (November 1996): 786–93.
- Jean-Richard-Dit-Bressel, Philip, and Gavan P McNally. 2015. “The Role of the Basolateral Amygdala in Punishment.” *Learning and Memory* 22 (2): 128–37. <https://doi.org/10.1101/lm.035907.114>.
- Johnson, David N. 1978. “Effect of Diazepam on Food Consumption in Rats.” *Psychopharmacology* 56 (1): 111–12. <https://doi.org/10.1007/BF00571417>.
- Kelley, Ann E., Stephanie L. Smith-Roe, and Matthew R. Holahan. 1997. “Response-Reinforcement Learning Is Dependent on N-Methyl-D-Aspartate Receptor Activation in the Nucleus Accumbens Core.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (22): 12174–79. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.22.12174>.
- Kilts, C. D., R. L. Commissaris, and R. H. Rech. 1981. “Comparison of Anti-Conflict Drug Effects in Three Experimental Animal Models of Anxiety.” *Psychopharmacology* 74 (3): 290–96. <https://doi.org/10.1007/BF00427112>.
- Kimm, Sunwhi, and June Seek Choi. 2018. “Sensory and Motivational Modulation of Immediate and Delayed Defensive Responses under Dynamic Threat.” *Journal of Neuroscience Methods* 307: 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.06.023>.
- Klawonn, Anna M, and Robert C Malenka. 2018. “Nucleus Accumbens Modulation in Reward and Aversion.” <https://doi.org/10.1101/sqb.2018.83.037457>.
- De la Cruz, Julie A.D. De, Tricia Coke, and Richard J. Bodnar. 2016. “Simultaneous Detection of C-Fos Activation from Mesolimbic and Mesocortical Dopamine Reward Sites Following Naive Sugar and Fat Ingestion in Rats.” *Journal of Visualized Experiments* 2016 (114): 1–12. <https://doi.org/10.3791/53897>.
- Laurent, Vincent, and R. Frederick Westbrook. 2009. “Inactivation of the Infralimbic but Not the Prelimbic Cortex Impairs Consolidation and Retrieval of Fear Extinction.” *Learning and Memory* 16 (9): 520–29. <https://doi.org/10.1101/lm.1474609>.
- Ledoux, Joseph E. 2000. “Emotion Circuits in the Brain. Annu Rev Neurosci.” *Annu Rev Neurosci* 23: 155–84. [10.1146/annurev.neuro.23.1.155](https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.155).
- Liljequist, Sture, and Jorgen A. Engel. 1984. “The Effects of GABA and Benzodiazepine Receptor Antagonists on the Anti-Conflict Actions of Diazepam or Ethanol.” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 21 (4): 521–25. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(84\)80033-7](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(84)80033-7).
- Limpens, Jules H.W., Ruth Damsteegt, Mark H. Broekhoven, Pieter Voorn, and Louk J.M.J. Vanderschuren. 2015. “Pharmacological Inactivation of the Prelimbic Cortex Emulates Compulsive Reward Seeking in Rats.” *Brain Research* 1628: 210–18. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.045>.

Bibliografia

- Lisboa, S. F., M. F. Stecchini, F. M.A. Corrêa, F. S. Guimarães, and L. B.M. Resstel. 2010. "Different Role of the Ventral Medial Prefrontal Cortex on Modulation of Innate and Associative Learned Fear." *Neuroscience* 171 (3): 760–68. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.09.048>.
- Lopez-Antunez. 1979. *Anatomía Funcional Del Sistema Nervioso*.
- McNaughton, Neil, and Philip J. Corr. 2004. "A Two-Dimensional Neuropsychology of Defense: Fear/Anxiety and Defensive Distance." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28 (3): 285–305. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.03.005>.
- Milad, MR and Quirck GJ. 2002. "Neurons in Medial Prefrontal Cortex Signal Memory for Fear Extinction." *Nature* 420 (6911): 70–74. <https://doi.org/10.1038/nature01138>.
- Milad, MR and Quirck GJ. 2012. "Fear Extinction as a Model for Translational Neuroscience: Ten Years of Progress." *Annual Review of Psychology* 63: 129–51. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.121208.131631>.
- Mogenson, Gordon J., Douglas L. Jones, and Chi Yiu Yim. 1980. "From Motivation to Action: Functional Interface between the Limbic System and the Motor System." *Progress in Neurobiology* 14 (2–3): 69–97. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(80\)90018-0](https://doi.org/10.1016/0301-0082(80)90018-0).
- Moorman, David E., Morgan H. James, Ellen M. McGlinchey, and Gary Aston-Jones. 2015. "Differential Roles of Medial Prefrontal Subregions in the Regulation of Drug Seeking." *Brain Research* 1628: 130–46. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.024>.
- Moorman, David E, and Gary Aston-Jones. 2015. "Prefrontal Neurons Encode Context-Based Response Execution and Inhibition in Reward Seeking and Extinction" 112 (30). <https://doi.org/10.1073/pnas.1507611112>.
- Nguyen, David, Anett Schumacher, Suzanne Erb, and Rutsuko Ito. 2015. "Aberrant Approach-Avoidance Conflict Resolution Following Repeated Cocaine Pre-Exposure." *Psychopharmacology* 232 (19): 3573–83. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4006-y>.
- Nicola, Saleem M. 2007. "The Nucleus Accumbens as Part of a Basal Ganglia Action Selection Circuit." *Psychopharmacology* 191 (3): 521–50. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0510-4>.
- Olds, James, and Peter Milner. 1954. "Positive Reinforcement Produced By Electrical Stimulation of Septal Area and Other Regions of Rat Brain." *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 47 (6): 419–27. <https://doi.org/10.1037/h0058775>.
- Onge, Jennifer R. St., and Stan B. Floresco. 2010. "Prefrontal Cortical Contribution to Risk-Based Decision Making." *Cerebral Cortex* 20 (8): 1816–28. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhp250>.
- Orsini, Caitlin A., Sara C. Heshmati, Tyler S. Garman, Shannon C. Wall, Jennifer L. Bizon, and

Bibliografia

- Barry Setlow. 2018. "Contributions of Medial Prefrontal Cortex to Decision Making Involving Risk of Punishment." *Neuropharmacology* 139: 205–16. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.07.018>.
- Orsini, Caitlin A., Markie L. Willis, Ryan J. Gilbert, Jennifer L. Bizon, and Barry Setlow. 2016. "Sex Differences in a Rat Model of Risky Decision Making." *Behavioral Neuroscience* 130 (1): 50–61. <https://doi.org/10.1037/bne0000111>.
- Parkinson, John A., Rudolf N. Cardinal, and Barry J. Everitt. 2000. "Limbic Cortical-Ventral Striatal Systems Underlying Appetitive Conditioning." *Progress in Brain Research* 126: 263–85. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(00\)26019-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(00)26019-6).
- Pastor, Verónica, and Jorge Horacio Medina. 2021. "Medial Prefrontal Cortical Control of Reward- and Aversion-Based Behavioral Output: Bottom-up Modulation." *European Journal of Neuroscience*, no. January: 1–24. <https://doi.org/10.1111/ejn.15168>.
- Paterson, Neil E., and Taleen Hanania. 2010. "The Modified Geller-Seifter Test in Rats Was Insensitive to GABA B Receptor Positive Modulation or Blockade, or 5-HT 1A Receptor Activation." *Behavioural Brain Research* 208 (1): 258–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.006>.
- Penas-Rincon, A.P., Ramirez-Lugo, L. and Sotres-Bayon, F. 2018. "Opposing Roles of the Anterior and Posterior Ventral Striatum in Choice Behavior Guided by Taste Aversion Memory." In *Society for Neuroscience*. San Diego, CA.
- Peters, Jamie, Peter W. Kalivas, and Gregory J. Quirk. 2009. "Extinction Circuits for Fear and Addiction Overlap in Prefrontal Cortex." *Learning and Memory* 16 (5): 279–88. <https://doi.org/10.1101/lm.1041309>.
- Phelps, Elizabeth A., and Joseph E. LeDoux. 2005. "Contributions of the Amygdala to Emotion Processing: From Animal Models to Human Behavior." *Neuron* 48 (2): 175–87. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.025>.
- Piantadosi, Patrick T., Dylan C.M. Yeates, Mathew Wilkins, and Stan B. Floresco. 2017. "Contributions of Basolateral Amygdala and Nucleus Accumbens Subregions to Mediating Motivational Conflict during Punished Reward-Seeking." *Neurobiology of Learning and Memory* 140: 92–105. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.02.017>.
- Pollard GT, Howard JL. 1990. "Effects of Drugs on Punished Behavior: Pre-Clinical Test for Anxiolytics." *Pharmacol Ther.* 45: 403–24. [10.1016/0163-7258\(90\)90075-d](https://doi.org/10.1016/0163-7258(90)90075-d).
- Pratt, Wayne E., and Sheri J.Y. Mizumori. 2001. "Neurons in Rat Medial Prefrontal Cortex Show Anticipatory Rate Changes to Predictable Differential Rewards in a Spatial Memory Task." *Behavioural Brain Research* 123 (2): 165–83. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00204-2](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00204-2).

Bibliografia

- Ramirez, Franchesca, Justin M. Moscarello, Joseph E. Le Doux, and Robert M. Sears. 2015. "Active Avoidance Requires a Serial Basal Amygdala to Nucleus Accumbens Shell Circuit." *Journal of Neuroscience* 35 (8): 3470–77. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1331-14.2015>.
- Rangel, Antonio, Colin Camerer, and P Read Montague. 2008. "A Framework for Studying the Neurobiology of Value-Based Decision Making." <https://doi.org/10.1038/nrn2357>.
- Rasmussen, Erin B. 2006. "' BEHAVIOR-RELEASING' Effects of Drugs: Anti-Punishment and Anti-Conflict Procedures." *Revista Mexicana de Análisis de La Conducta* 32(1): 73–91.
- Resstel, L. B.M., R. F. Souza, and F. S. Guimarães. 2008. "Anxiolytic-like Effects Induced by Medial Prefrontal Cortex Inhibition in Rats Submitted to the Vogel Conflict Test." *Physiology and Behavior* 93 (1–2): 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.08.009>.
- Rex, A., D. N. Stephens, and H. Fink. 1996. "'Anxiolytic' Action of Diazepam and Abecarnil in a Modified Open Field Test." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 53 (4): 1005–11. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)02121-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)02121-3).
- Reynolds, Sheila M, and Kent C Berridge. 2001. "Fear and Feeding in the Nucleus Accumbens Shell: Rostrocaudal Segregation of GABA-Elicited Defensive Behavior Versus Eating Behavior."
- Rhodes, S. E.V., and A. S. Killcross. 2007. "Lesions of Rat Infralimbic Cortex Enhance Renewal of Extinguished Appetitive Pavlovian Responding." *European Journal of Neuroscience* 25 (8): 2498–2503. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05486.x>.
- Roitman, Mitchell F., Robert A. Wheeler, and Regina M. Carelli. 2005. "Nucleus Accumbens Neurons Are Innately Tuned for Rewarding and Aversive Taste Stimuli, Encode Their Predictors, and Are Linked to Motor Output." *Neuron* 45 (4): 587–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.055>.
- Roitman, Mitchell F, Garret D Stuber, Paul E M Phillips, R Mark Wightman, and Regina M Carelli. 2004. "Behavioral/Systems/Cognitive Dopamine Operates as a Subsecond Modulator of Food Seeking." <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3823-03.2004>.
- Rose, J. E., & Woolsey, C. N. 1948. "The Orbitofrontal Cortex and Its Connections with the Mediodorsal Nucleus in Rabbit, Sheep and Cat." *Association for Research in Nervous and Mental Disease* 27 (1): 210–32.
- Sangha, Susan, Paul D. Robinson, Quentin Greba, Don A. Davies, and John G. Howland. 2014. "Alterations in Reward, Fear and Safety Cue Discrimination after Inactivation of the Rat Prelimbic and Infralimbic Cortices." *Neuropsychopharmacology* 39 (10): 2405–13. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.89>.

Bibliografía

- Setlow, Barry, Geoffrey Schoenbaum, and Michela Gallagher. 2003. "Neural Encoding in Ventral Striatum during Olfactory Discrimination Learning." *Neuron* 38 (4): 625–36. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00264-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00264-2).
- Sierra-Mercado, Demetrio, Nancy Padilla-Coreano, and Gregory J. Quirk. 2011a. "Dissociable Roles of Prelimbic and Infralimbic Cortices, Ventral Hippocampus, and Basolateral Amygdala in the Expression and Extinction of Conditioned Fear." *Neuropsychopharmacology* 36 (2): 529–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.184>.
- Sokolowski, J. D., and John D. Salamone. 1998. "The Role of Accumbens Dopamine in Lever Pressing and Response Allocation: Effects of 6-OHDA Injected into Core and Dorsomedial Shell." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 59 (3): 557–66. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(97\)00544-3](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(97)00544-3).
- Somogyi, Peter, Gábor Tamás, Rafael Lujan, and Eberhard H. Buhl. 1998. "Salient Features of Synaptic Organisation in the Cerebral Cortex." *Brain Research Reviews* 26 (2–3): 113–35. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(97\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(97)00061-1).
- Sotres-Bayon, Francisco, Christopher K. Cain, and Joseph E. LeDoux. 2006. "Brain Mechanisms of Fear Extinction: Historical Perspectives on the Contribution of Prefrontal Cortex." *Biological Psychiatry* 60 (4): 329–36. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.10.012>.
- Sotres-Bayon, Francisco, and Gregory J. Quirk. 2010a. "Prefrontal Control of Fear: More than Just Extinction." *Current Opinion in Neurobiology* 20 (2): 231–35. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.02.005>.
- Sotres-Bayon, Francisco, and Gregory J. Quirk. 2010b. "Prefrontal Control of Fear: More than Just Extinction." *Current Opinion in Neurobiology*. *Curr Opin Neurobiol*. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.02.005>.
- Sotres-Bayon, Francisco, Demetrio Sierra-Mercado, Enmanuelle Pardilla-Delgado, and Gregory J. Quirk. 2012. "Gating of Fear in Prelimbic Cortex by Hippocampal and Amygdala Inputs." *Neuron* 76 (4): 804–12. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.028>.
- Stefanik, Michael T., Yonatan M. Kupchik, and Peter W. Kalivas. 2016. "Optogenetic Inhibition of Cortical Afferents in the Nucleus Accumbens Simultaneously Prevents Cue-Induced Transient Synaptic Potentiation and Cocaine-Seeking Behavior." *Brain Structure and Function* 221 (3): 1681–89. <https://doi.org/10.1007/s00429-015-0997-8>.
- Stefanik, Michael T., Khaled Moussawi, Yonatan M. Kupchik, Kyle C. Smith, Rachel L. Miller, Mary L. Huff, Karl Deisseroth, Peter W. Kalivas, and Ryan T. Lalumiere. 2013. "Optogenetic Inhibition of Cocaine Seeking in Rats." *Addiction Biology* 18 (1): 50–53. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2012.00479.x>.

Bibliografia

- Tye, Kay M. 2018. "Neural Circuit Motifs in Valence Processing." *Neuron* 100 (2): 436–52. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.001>.
- Uylings, Harry B.M., Henk J. Groenewegen, and Bryan Kolb. 2003. "Do Rats Have a Prefrontal Cortex?" *Behavioural Brain Research* 146 (1–2): 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.09.028>.
- Ventura, Rossella, Emanuele Claudio Latagliata, Enrico Patrono, Matteo Di Segni, and Stefano Puglisi-Allegra. 2013. "Food Seeking in Spite of Harmful Consequences." *NeuroMethods* 74: 235–54. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-104-2_14.
- Vertes, Robert P. 2004. "Differential Projections of the Infralimbic and Prelimbic Cortex in the Rat." *Synapse* 51 (1): 32–58. <https://doi.org/10.1002/syn.10279>.
- Vidal-Gonzalez, Ivan, Benjamín Vidal-Gonzalez, Scott L. Rauch, and Gregory J. Quirk. 2006. "Microstimulation Reveals Opposing Influences of Prelimbic and Infralimbic Cortex on the Expression of Conditioned Fear." *Learning and Memory* 13 (6): 728–33. <https://doi.org/10.1101/lm.306106>.
- Vogel, John R., Bernard Beer, and Donald E. Clody. 1971. "A Simple and Reliable Conflict Procedure for Testing Anti-Anxiety Agents." *Psychopharmacologia* 21 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1007/BF00403989>.
- Wallis, Jonathan D. 2012. "Cross-Species Studies of Orbitofrontal Cortex and Value-Based Decision-Making." *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.2956>.
- Walsh, Roger N., and Robert A. Cummins. 1976. "The Open-Field Test: A Critical Review." *Psychological Bulletin* 83 (3): 482–504. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.83.3.482>.
- Walters, Cody J., Jerrius Jubran, Ayaka Sheehan, Matthew T. Erickson, and A. David Redish. 2019. "Avoid-Approach Conflict Behaviors Differentially Affected by Anxiolytics: Implications for a Computational Model of Risky Decision-Making." *Psychopharmacology* 236 (8): 2513–25. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05197-0>.
- Walton, Mark E, David M Bannerman, and Matthew F S Rushworth. 2002. "The Role of Rat Medial Frontal Cortex in Effort-Based Decision Making."
- Watson, Thomas C, Nadia L Cerminara, Bridget M Lumb, and X Richard Apps. 2016. "Neural Correlates of Fear in the Periaqueductal Gray." <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1100-16.2016>.
- Zahm, D. S., and Lennart Heimer. 1993. "Specificity in the Efferent Projections of the Nucleus Accumbens in the Rat: Comparison of the Rostral Pole Projection Patterns with Those of the Core and Shell." *Journal of Comparative Neurology* 327 (2): 220–32. <https://doi.org/10.1002/cne.903270205>.
- Zahm, Daniel S. 2000. "An Integrative Neuroanatomical Perspective on Some Subcortical

Bibliografia

Substrates of Adaptive Responding with Emphasis on the Nucleus Accumbens.” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 24 (1): 85–105. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00065-2).

Zhou, Haocheng, Erik Martinez, Harvey H Lin, Runtao Yang, Jahrane Antonio Dale, Kevin Liu, Dong Huang, et al. 2018. “Inhibition of the Prefrontal Projection to the Nucleus Accumbens Enhances Pain Sensitivity and Affect Citation.” <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00240>.

Material suplementario

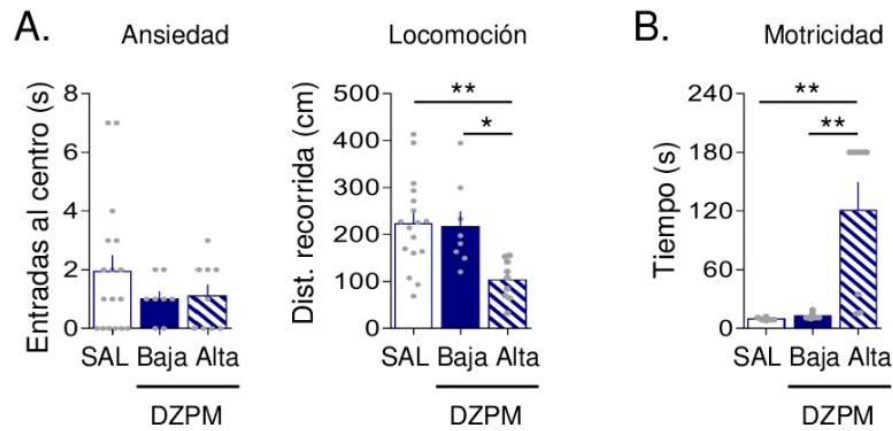


Figura 1. Una dosis baja de diazepam, pero no una dosis alta, no altera la locomoción y la motricidad. Inyectamos dos dosis de diazepam (1 y 2 mg/kg) para evaluar la conducta de ansiedad, la locomoción en el campo abierto y la coordinación motora en la prueba de la viga elevada. **A**, Las ratas inyectadas con una dosis de diazepam (DZPM) de 1mg/kg (dosis baja, n= 8) o 2 mg/kg (alta dosis, n= 9) mostraron un número similar de entradas en el centro del campo abierto que las ratas inyectadas con salina (SA, n = 7). Las ratas inyectadas con una dosis alta de diazepam mostraron un decremento en la distancia recorrida del campo abierto, mientras que las ratas inyectadas con una dosis baja recorrieron el campo abierto de manera similar que las ratas del grupo salina. **B**, Las ratas que se inyectaron con la dosis alta de diazepam (n = 8) mostraron un incremento en el tiempo para llegar al final de la viga elevada.

Material suplementario

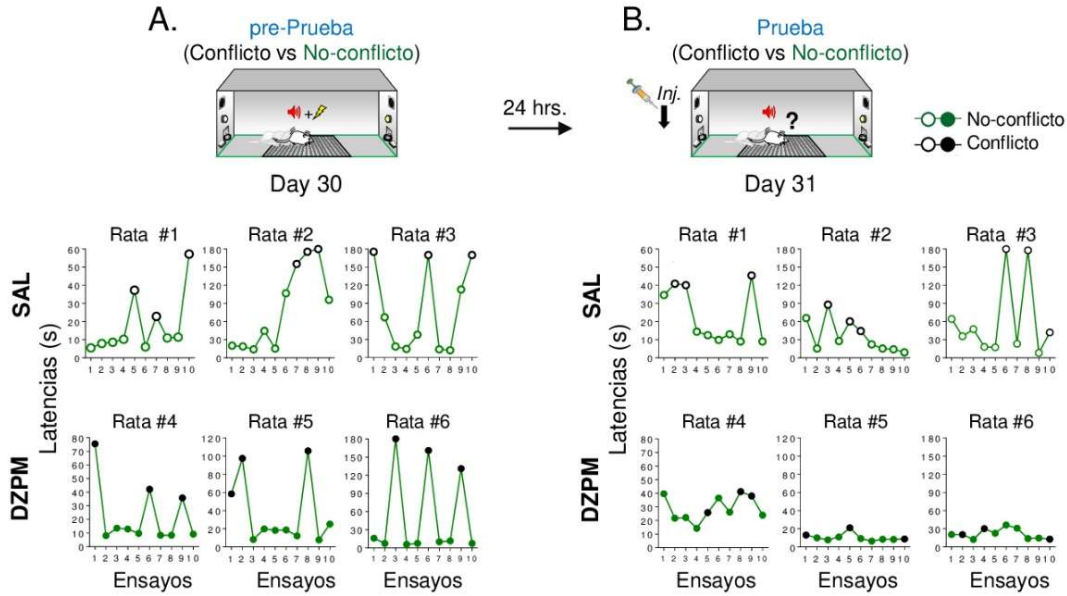


Figura 2. Ejemplo, ensayo por ensayo, de ratas antes y después de las inyecciones de diazepam en la tarea de conflicto mediado por cruces A. Antes de la inyección (pre-Prueba) las ratas tratadas con salina (SAL: Rata #1, Rata # 2, Rata # 3) o con diazepam (DZPM: Rata #4, Rata #, Rata #6) de manera similar mostraron altas latencias de cruces (s) durante los ensayos de conflicto (negro) y cortas latencias de cruces durante los ensayos de no conflicto (verde). **B.** Después de la inyección (Prueba) las ratas tratadas con diazepam redujeron dramáticamente sus latencias de cruces durante los ensayos de conflicto sin afectar los ensayos de no conflicto, mientras que, el desempeño de las ratas que recibieron salina fue similar al de la pre-Prueba.

Material suplementario

TAREAS DE CONFLICTO	Estímulo Aversivo	Estímulo Apetitivo	Motiv. Fisiológica	Impulso Motivacional	Aparato (orientación)	Prueba de elección
Mediado por CRUCES	Sonido + descarga (<i>aprendido</i>)	Luz + palanqueo por comida (<i>aprendido</i>)	Hambre	Buscar recompensa a pesar de una amenaza	Caja rectangular con parrilla (bidireccional)	Las mismas ratas discriminan entre ensayos de conflicto y no conflicto
Mediado por DESCENSO	Bajada + descarga (<i>aprendido</i>)	Agua dulce (<i>innato</i>)	Sed	Buscar recompensa a pesar de una amenaza	Plataforma y parrilla (unidireccional)	Grupos diferentes de ratas para conflicto y no conflicto
Mediado por FORRAJEJO	Luz en el centro del campo abierto (<i>innato</i>)	Pellets de azúcar (<i>innato</i>)	Hambre	Buscar recompensa a pesar de una amenaza	Campo abierto (exploración libre)	Grupos diferentes de ratas para conflicto y no conflicto

Tabla 1. Tareas de conflicto motivacional. Se muestran los estímulos, condiciones y el tipo de aparato conductual utilizado para cada una de las tareas de conflicto motivacional. En la *tarea de conflicto mediado por cruces*, las ratas hambrientas, guiadas por señales apetitivas y aversivas (en una caja bidireccional), eligen buscar pellets de azúcar a pesar de la presencia de una amenaza. En la *tarea de conflicto mediado por descenso*, las ratas sedientas guiadas por un estímulo aversivo aprendido (en una caja de una sola dirección), eligen buscar agua endulzada a pesar de la presencia de una amenaza. En la *tarea de conflicto mediado por forrajeo*, las ratas hambrientas guiadas por estímulos aversivos y apetitivos innatos (en la arena de un campo abierto), eligen buscar pellets de azúcar a pesar de la presencia de una amenaza.



Conflict Test Battery for Studying the Act of Facing Threats in Pursuit of Rewards

Elizabeth Illescas-Huerta¹, Leticia Ramirez-Lugo¹, Rodrigo O. Sierra²,
Jorge A. Quillfeldt³ and Francisco Sotres-Bayon^{1*}

¹ Cell Physiology Institute-Neuroscience, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico, ² Department of Physiology, University of Szeged, Szeged, Hungary, ³ Department of Biophysics, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Rutsuko Ito,
University of Toronto, Canada

Reviewed by:

June-Seek Choi,
Korea University, South Korea
Jeroen Verharen,
University of California, Berkeley,
United States

*Correspondence:

Francisco Sotres-Bayon
sotres@ifc.unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Decision Neuroscience,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 23 December 2020

Accepted: 19 March 2021

Published: 04 May 2021

Citation:

Illescas-Huerta E,
Ramirez-Lugo L, Sierra RO,
Quillfeldt JA and Sotres-Bayon F
(2021) Conflict Test Battery
for Studying the Act of Facing Threats
in Pursuit of Rewards.
Front. Neurosci. 15:645769.
doi: 10.3389/fnins.2021.645769

Survival depends on the ability of animals to avoid threats and approach rewards. Traditionally, these two opposing motivational systems have been studied separately. In nature, however, they regularly compete for the control of behavior. When threat- and reward-eliciting stimuli (learned or unlearned) occur simultaneously, a motivational conflict emerges that challenges individuals to weigh available options and execute a single behavioral response (avoid or approach). Most previous animal models using approach/avoidance conflicts have often focused on the ability to avoid threats by forgoing or delaying the opportunity to obtain rewards. In contrast, behavioral tasks designed to capitalize on the ability to actively choose to execute approach behaviors despite threats are scarce. Thus, we developed a behavioral test battery composed of three conflict tasks to directly study rats confronting threats to obtain rewards guided by innate and conditioned cues. One conflict task involves crossing a potentially electrified grid to obtain food on the opposite end of a straight alley, the second task is based on the step-down threat avoidance paradigm, and the third one is a modified version of the open field test. We used diazepam to pharmacologically validate conflict behaviors in our tasks. We found that, regardless of whether competing stimuli were conditioned or innate, a low diazepam dose decreased risk assessment and facilitated taking action to obtain rewards in the face of threats during conflict, without affecting choice behavior when there was no conflict involved. Using this pharmacologically validated test battery of ethologically designed innate/learned conflict tasks could help understand the fundamental brain mechanisms underlying the ability to confront threats to achieve goals.

Keywords: approach-avoidance, choice, decision-making, prefrontal, amygdala, accumbens, fear

INTRODUCTION

To ensure survival in nature, animals must avoid threats and pursue rewards. This ability involves that animals use inherited or assigned value information of stimuli in the environment (negative or positive valence) to control motivated behaviors (Rangel et al., 2008; Tye, 2018). Traditionally, these two motivational valence systems have been successfully studied separately (Hu, 2016). Defensive

and avoidance responses triggered by threats (LeDoux, 2000) have been generally studied separately from approach behaviors elicited by rewards (Cardinal et al., 2002). During foraging, however, animals regularly encounter threats and rewards simultaneously and are consequently challenged to engage in opposing binary choices (avoid or approach) (Choi and Kim, 2010; Hayden and Walton, 2014; Amir et al., 2015; Mobbs et al., 2018). Such a motivational conflict involves a cost–benefit decision determined by the competition processes between these two mutually exclusive systems interacting (Corr, 2013; McNaughton and Corr, 2014). Conflict is elicited when an individual is challenged to make a choice guided by stimuli with opposing valences (threat and reward) to execute a choice between two incompatible behavioral responses (avoid or approach). During such forms of conflict, individuals must either choose to avoid threats at the cost of not benefiting from rewards or to approach rewards at the cost of facing threats. Interestingly, when reaching the choice point, rodents display characteristic oscillatory conflict behaviors that include hesitantly moving back and forward (Miller, 1944), head dips (Takeda et al., 1998), and stretched postures (Grant and Mackintosh, 1963), as if assessing the risks over the decision to make (risk-assessment behaviors).

Conflict behaviors are sensitive to the action of anti-anxiety drugs (Gray, 1977, 1982; McNaughton and Corr, 2014). Traditionally, approach/avoidance conflict tasks have been useful in validating benzodiazepines like diazepam (DZPM) (Vogel et al., 1971; Rodgers et al., 1997; Calhoun and Tye, 2015). More recent conflict animal models have often focused on studying the decision animals make to avoid threats while forgoing the opportunity or delaying the time to obtain rewards (Moscarello and LeDoux, 2013; Bravo-Rivera et al., 2014; Friedman et al., 2015; Burgos-Robles et al., 2017; Piantadosi et al., 2017; Schumacher et al., 2018; Choi et al., 2019; Miller et al., 2019; Verharen et al., 2019; Walters et al., 2019). Yet, the ability of animals to choose to forage for resources by confronting threats remains understudied and lack a behavioral test battery to comprehensively characterize it.

To directly study animals seeking rewards in the face of threats, we developed three choice-mediated conflict tasks in rodents based on traditional behavioral assays. All of our behavioral tasks involve the comparison of conflict-based vs. no-conflict-based choice behaviors. They differ, however, in that rats must use stimuli with innate and/or acquired negative valences to guide conflict choices. The crossing-mediated conflict task, based on the task used to map self-stimulation brain sites (Olds and Milner, 1954), uses competing cued-conditioned stimuli and involves comparatively assessing the time it takes rats to cross a potentially electrified grid (“threat” zone) to obtain food on the opposite side of a straight alley (“safe” zone) during conflict and no-conflict trials (Bravo-Rivera and Sotres-Bayon, 2020). The step down-mediated conflict task, based on the step-down threat avoidance paradigm, uses conditioned aversive and innate appetitive stimuli. Finally, the foraging-mediated innate conflict task, based on the open field test (Walsh and Cummins, 1976), involves placing food in a brightly lit arena center. We tested the validity of our conflict tasks by administering systemic injections of a commonly used benzodiazepine drug, DZPM.

We found that, independently of whether competing stimuli were conditioned or innate, a low dose of DZPM decreased risk assessment and facilitated the ability of rats to actively confront threats, incentivized by reward availability during conflict choice behaviors only.

MATERIALS AND METHODS

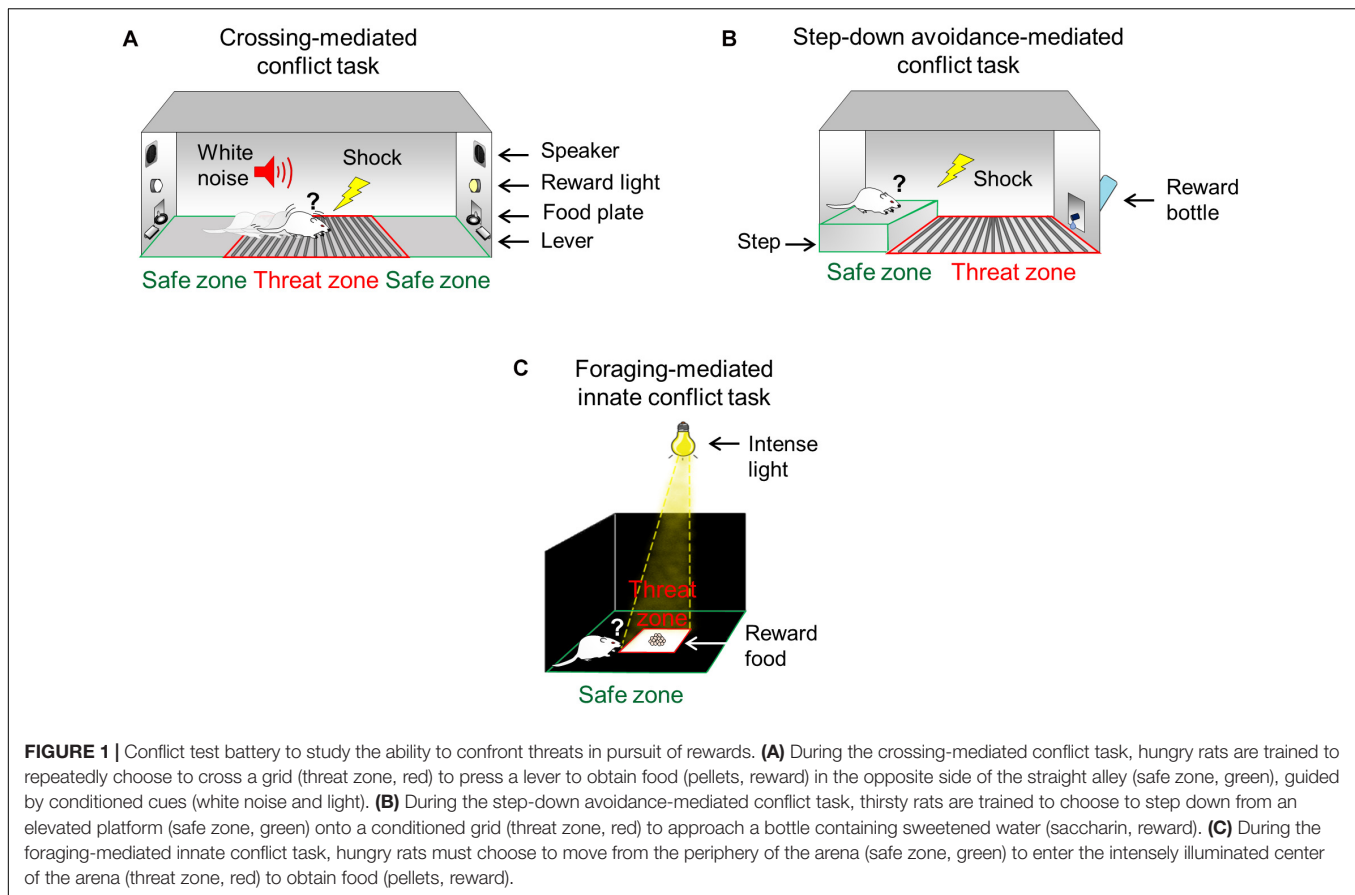
All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Universidad Nacional Autónoma de México, in compliance with the National Ministry of Health guidelines for the care of laboratory animals. A total of 160 adult male Wistar rats (Instituto de Fisiología Celular breeding colony) 2–3 months of age, weighing 250–300 g were housed in individual polyethylene cages, handled daily to diminish stress responses, and maintained on a standard 12 h light/dark schedule. All experiments were performed during the light phase. To maintain a stable motivation to eat or drink during behavioral training and tests, rats were food restricted (12 g/day of standard laboratory rat chow with a 5-g bonus feeding at the end of each week to maintain rats at 85% of their initial weight) or water restricted (12 ml/day; 6 ml in the morning and 6 ml in the afternoon), respectively.

Task 1: Crossing-Mediated Conflict Task

Rats were trained and tested in straight alleys that consisted of acrylic walls with stainless-steel frames (100 cm long × 30 cm wide × 50 cm tall), located in a sound-attenuating cubicle (150 cm long × 70 cm wide × 140 cm tall). The alleys consisted of three zones: two “safe” zones and one “threat” zone (**Figure 1A**). Each “safe” zone (20 cm long × 30 cm wide) was located on the opposite ends of the alley, and the “threat” zone (60 cm long × 30 cm wide) was located between the two “safe” zones. The floor of the “threat” zone was made of stainless-steel bars (4.8 mm diameter), which delivered a scramble footshock (Coulbourn Instruments, United States), while the floor of “safe” zones was made of acrylic. The “safe” zone included a speaker and standard operant chamber components (cue light, a lever connected to a pellet dispenser, and a food receptacle). The alleys were interfaced with a computer running custom scripts that controlled apparatus hardware (food pellet delivery, cue lights, speakers, and shocker) and recorded task events (lever presses at each end of the alley). The shock grids, the alley floors, and the walls were cleaned with soapy water and 70% alcohol and dried with paper towels between experiments. Prior to conflict training, all rats were trained to press a lever to obtain sucrose pellets (45 mg, dustless precision pellets, Bioserve, United States) in a fixed reinforcement schedule (each lever press was reinforced with one pellet). All sessions started and ended with context-alone exposure (5 min without cue lights, shocks, or noise).

Conflict Training

Conflict training involved five succeeding stages: two stages of reward training (reward association and reward crossing), two stages of threat training (threat association and threat crossing), and a final stage of discrimination training to distinguish between



conflict and no-conflict trials. Conflict training occurred over a total of 30 days.

Reward training

Initially, rats confined to one end of the alley (“safe” zone) using an opaque acrylic wall were trained to associate food availability with a light cue (*Reward association*). A pellet was dispensed to the food receptacle with each lever press when the cue light was illuminated (light trial), while no pellet was delivered in the absence of light (no-light trial). Each light trial ended after a randomly assigned number of rewarded pressing events were achieved (ranging from 5 to 20 presses; a custom script running in a computer associated with the apparatus generated a random number and assigned the type of trial to present), whereas each no-light trial ended after a randomly assigned time had elapsed (ranging from 30 to 180 s). Each reward conditioning session was limited to 30 min, and it involved ~10 light trials and ~10 no-light trials, which resulted in ~15 min per trial type. One session was given per day across 6 days (days 1–6 of conflict training). Next, rats were trained to cross from one end of the alley to the opposite side (from one “safe” zone to the other) to obtain food signaled by light (*Reward crossings*). Short acrylic barriers (9 cm tall) were placed between the grid and “safe” zones to delimit and commit choice-mediated crossing behavior in time and space (choose point). A reward crossing trial started when a light was illuminated in the side of the alley opposite to the

location of the rat. The trial ended when the light was turned off, after either the rat had crossed to the opposite “safe” zone and pressed the lever or 180 s had passed without crossing. To promote goal-oriented crosses guided by tracking location of light cue, rather than nonsignaled habitual reactions, rats received one to three reinforced lever presses on the same “safe” zone. Each reward crossing session was composed of 30 trials. One session was given per day for 5 days (days 7–11 of conflict training). Reward training occurred over a total of 11 days (6 days of reward association and 5 days of reward crossing training). By this point, rats had learned that reward crossings involved actively tracking food availability signaled by the cue light in each of the “safe” zones of the alley in the absence of conflict (crossing to obtain food without threat).

Threat training

Rats confined to the “threat” zone (middle of the alley) using opaque acrylic walls and a ceiling (similar dimensions to standard classical threat conditioning chambers: 30 cm long, 25 cm wide, 30 cm tall) were trained to associate a white noise (85 dB for 30 s) with a mild footshock (0.5 mA for 1 s) (*Threat association*). To allow the sound coming from opposite sides of the alley to enter the confined conditioning area, the acrylic ceiling was perforated (1.2 cm diameter). Foot shocks were randomly delivered during the 30-s noise presentation to avoid a temporal noise/shock associations that may limit threat-related responses to a specific

time (a custom script running in a computer associated with the apparatus generated a random number and delivered the shock). Five noise-shock pairings were delivered per day with a variable intertrial interval of 1–3 min. One session was given per day for 4 days. On the next day, two noise-alone trials (in the absence of shocks) were delivered to test for cued threat memory (days 12–16 of conflict training). Next, rats were trained to cross the alley to obtain food (guided by the light cue), while the threat cue (noise) was presented simultaneously (*Threat crossings*). A threat crossing trial started and ended the same way as a reward crossing trials. The difference between reward and threat crossings was that during threat crossings, rats were challenged to cross to the other side of the alley to obtain food (signaled by the conditioned light) by facing the co-occurring threat (0.5 mA shock signaled by the conditioned noise). Short acrylic barriers (introduced since Reward crossing training) prevented rats from getting exposed to the electrified grid before committing to cross (hesitation at the choice point). The duration of threat crossing trials was increased across days to gradually intensify threat in crossing sessions. Intertrial intervals ranged from 1 to 3 min, and each session was limited to 30 min. One session was given per day for 5 days (days 17–21 of conflict training). Threat crossing trials lasted 30 s in the first 2 days, 60 s on the third day, 90 s on the fourth day, and 120 s on the fifth day of training. Each trial ended either after the time of crossing elapsed (30–120 s) or when rats successfully crossed and pressed the lever on the opposite side of the alley. Threat training occurred over a total of 10 days (5 days of threat association and 5 days of threat crossing training). By this point, rats had learned that threat crossings guided by the simultaneous occurrence of light and sound cues involved conflict (crossing to obtain food despite threat).

Discrimination training

The final stage of conflict training consisted of learning to discriminate between no-conflict (crossing to obtain food without threat) and conflict (crossing to obtain food despite threat) trials across 9 days (*Discrimination*). Each discrimination session consisted on a total of 30 crossing trials. Each session was divided into three blocks of 10 trials. Each block of 10 trials consisted of seven or nine no-conflict trials and one or three conflict trials (10 or 30% chance of threat trials, respectively). To prevent rats from predicting types of trials, they were presented in a different sequence across 10-trial blocks (a custom script running in a computer associated with the apparatus generated a random number and assigned the type of trial to present considering the constricted number of types of trials). On each trial, rats were allowed a limited time to choose whether to cross or not to cross the alley (180 s). One session was given per day for 9 days (days 22–30 of conflict training). To gradually and progressively increase the risk of threat crossing, the proportion of conflict trials and intensity of shock increased across days. Conflict crossings were presented with a 10% chance of threat (3 conflicts vs. 27 no-conflict trials) and 0.5 mA shock intensity the first 3 days (22–24 days), the next 3 days (25–27 days) with a 30% chance of threat (9 conflict vs. 21 no-conflict trials) using the same shock intensity as the sessions before, and finally, the last 3 days (28–30 days) with the same percentage of threat

occurrence as the session before but with increased intensity of shock of 0.1 mA/day until it reached 0.8 mA at the end of discrimination training. At this point, rats had learned to discriminate between conflict against no-conflict trials. Rats that did not learn to discriminate between types of trials by the end of discrimination training ($p > 0.05$ in the comparison between conflict and no-conflict trials in the last block of trials: 2 out of 18), and rats that did not learn to cross in 180 s were excluded from the study (2 out of 18). Therefore, all trials for all animals included in the study were rewarded.

Conflict Test

The conflict test was performed 1 day after conflict training ended. Rats were tested with 10 crossing trials. These trials were presented in the same conditions as the last day of discrimination training (30% chance of threat: three conflict and seven no-conflict pseudorandomly presented trials) but in the absence of shocks. Results were expressed comparing the average of conflict against no-conflict trials before (pre-test) and after (test) injections.

Task 2: Step-Down Avoidance-Mediated Conflict Task

Rats were trained and tested in a modified step-down inhibitory avoidance chamber (50 cm long × 25 cm wide × 25 cm tall) located in a sound-attenuating cubicle (61.5 cm long × 62.5 cm wide × 65 cm tall). The step-down chamber consisted of two zones: one “safe” and one “threat” zone (**Figure 1B**). The floor of the “threat” zone (30 cm long × 25 cm wide) consisted of stainless-steel bars (4.8 mm diameter) delivering a scrambled footshock (Coulbourn Instruments, United States), while the floor of the “safe” zone (20 cm long × 23.5 cm wide × 6 cm tall) was an acrylic-covered elevated step platform. An acrylic sliding door was located between the threat and safe zones to allow precise timing of step-down choice behavior (choice point). Compared to the standard step-down avoidance (Izquierdo et al., 1997), the modified chamber includes a bottle with 12 ml of saccharin solution (0.1%) placed on the wall of the “threat” zone opposite from the “safe” zone. This modification represents a strong incentive that motivates the animal to step down from the safe platform. Before the training started, rats were habituated to the step-down behavior in the chamber for 1 day (the bottle was present but empty) and water deprived for 12 h. Training and test sessions started with rats confined to the elevated platform for 5 min in the safe “zone” (the sliding door was closed). Shock grids as well as chamber floors and walls were cleaned with soapy water and 70% alcohol and dried with paper towels between experiments.

Conflict Training

Two variants of the step-down task were used in separate groups of rats. One task involved conflict training, while the other task did not involve conflict. The only difference between these tasks is that conflict training involved water-restricted rats (thirsty), while rats in the no-conflict task had free access to water (not thirsty). Both tasks involved reward presentations and threat association training. During reward presentation sessions, after

pulling the sliding door, rats were allowed to drink from the bottle placed in the opposite side of the elevated platform (“threat” zone) containing saccharin solution (12 ml). Each reward presentation session was limited to 10 min. One session was given per day for 5 days (days 1–5) to allow familiarization with the chamber, overcoming neophobia to the novel taste (saccharin) and achieving stable reward sampling across days. The following 2 days (days 6 and 7), rats were trained to associate the act of stepping down from the platform with a mild footshock (0.5 mA). This footshock lasted until rats came back to the safety platform. One trial per session was given per day. Step-down training for each of the two tasks (conflict and no-conflict) occurred over a total of 7 days. By this point, two separate groups of rats had been trained in two different conditions: one group (motivated to drink) had learned to step down to obtain sweetened water despite threat (conflict group), while another group (not motivated to drink) had learned to avoid threat by not stepping down (no-conflict group).

Conflict Test

A test that involved conflict and another that did not involve conflict were performed 1 day after training ended. Rats were tested in the same conditions of the last day of training of each of the groups (conflict and no-conflict) but in the absence of shocks. Results were expressed comparing the average of conflict and no-conflict group step-down latencies before (pre-test) and after (test) injections.

Task 3: Foraging-Mediated Innate Conflict Task

Rats were tested in a modified open field arena (90 cm long, 90 cm wide, and 60 cm tall) with walls made of wood and floors made of textured transparent acrylic, located in a dark room. The arena was divided into two zones: one “safe” zone (60 cm long and 60 cm wide) and one “threat” zone (30 cm long and 30 cm wide) (Figure 1C). Compared to the standard open field (Stefanski et al., 1992), our modified arena includes an intense beam of light (1500 lx) focused at the center of the arena (“threat” zone), allowing the periphery of the arena to remain dark (“safe” zone). This modification represents an added innately aversive stimulus to the already innately aversive center of the open field without affecting the periphery of the arena. The floor and wooden walls were cleaned with soapy water and 70% alcohol and dried with paper towels between experiments.

Conflict Test

Two types of open field tests were used in separate groups of rats. One test involved conflict, while the other test did not involve conflict. The only difference between these two tests is that the conflict test involved placing 30 sucrose pellets (1.350 g) in the center of the field (“threat” zone) to motivate rats to forage for food (Britton and Britton, 1981), whereas the no-conflict test did not involve food in the arena. Motivation to forage for food was maintained in the periphery by placing five sucrose pellets (0.9 g) on each of the corners of the arena. To avoid innate aversion to the novel taste (neophobia) of pellets, rats received 20 sucrose pellets (1.125 g) in their home cages for 2 days before tests. Rats

were individually placed into the “safe” zone, and their time spent in the “threat” and the “safe” zones was recorded for 10 min. The time spent at the center of the open field arena was used to evaluate foraging despite threat (conflict) and the time spent in the periphery was used to evaluate foraging without the threat (no conflict). Test results were expressed comparing the average times spent on either center or periphery of the arena after injections in conflict and no-conflict groups.

Open field test

Locomotor activity and anxiety were evaluated in a standard open field arena (no food or intense light involved) (Schmitt and Hiemke, 1998). Rats were individually placed at the center of the open field arena, and their behavior was recorded for 5 min. Distance traveled in the open field was used to evaluate locomotion, and entries at the center of the arena were used to evaluate anxiety-like behavior.

Beam walking test

Motor coordination was evaluated using beam walking behavior (Goldstein and Davis, 1990). The beam was a wooden bar (100 cm long × 2 cm wide) placed 80 cm above the floor with an inclination of 15°. An opened home cage was placed at the end of the beam to motivate rats to walk. The latencies to arrive at the end of the beam and enter into the home cage were recorded. Rats were trained for 5 days to walk on the beam toward the home cage, initially (days 1 and 2) starting at a distance of 50 cm and then (days 3–5) starting at a distance of 100 cm from the home cage. Rats were allowed to stay in the home cage for 30 s. The next day, rats were tested on beam walking.

Food intake test

Feeding behavior was evaluated by calculating food intake in rats in their home cages (Britton and Britton, 1981; Rex et al., 1996). Food consumption was assessed across 5 days. Each day, rats were presented with 30 g of sucrose pellets placed in a familiar food plate. To calculate food intake, the food plate was weighed before and after 30 min of food presentation.

Saccharin intake test

Drinking behavior was evaluated by calculating free intake of saccharin solution (sweetened water) in rats in their home cages. Sweetened water consumption was assessed across 5 days. Each day, rats were presented with a familiar water bottle containing 50 ml of saccharin solution (0.1%). To calculate saccharin intake, the water bottle was weighed before and after 30 min water bottle presentation.

Systemic Drug Administration

Diazepam (1 or 2 mg/kg of weight) dissolved in a sterile solution (DZPM, 5 mg/ml, Valium®, Roche, México) or an equivalent volume of saline solution (SAL) was subcutaneously administered 30 min before all behavioral tests.

Data Collection and Analysis

All behaviors were recorded with digital video cameras (Provision, model D-380D5) located above each task apparatus. Lever-pressing events were recorded by a computer running

MATLAB® (MathWorks Inc.) custom scripts interfaced with the straight alley. Lever-pressing events (presses per minute) during light or no-light trials were expressed as blocks of 10 min. Each session (one per day) consisted of three of these 10-min blocks. Crossing latencies consisted of the total time (seconds) that rats spent to cross to the opposite side of the straight alley and press the lever to obtain food. Latencies to cross were expressed as blocks of 10 trials. Each training session (one per day) consisted of three of these 10-trial blocks, and the test session consisted of one block of 10 trials. Freezing responses were expressed as the percent of time spent without movement (except for respiration) during context alone exposure (5 min baseline before noise presentations) or 60 s after noise presentations. Step-down latencies were expressed as the total time (seconds) rats took, after pulling the sliding door, to step down from the elevated platform with four paws onto the grid. Beam walking latencies consisted of the total time (seconds) spent before arriving at the end of the beam to enter the home cage. Food and sweetened water intake were calculated by comparing food-receptacle or water-bottle weight (grams) before and after 30 min of food bottle presentation. Time spent freezing, as well as step-down, beam walking latencies, food and sweetened water intake, as well as risk assessment responses were manually recorded by trained observers blinded to the experimental conditions. Behavior in the open field arenas was recorded using a tracking software (ANY-maze; Stoelting, United States) and expressed as traveled distance (cm) or time spent (seconds) at the center of the field during 5 or 10 min. The number of risk assessment behavioral events (approach/avoidance oscillations toward the reward site) were counted at the choice point, where, depending on the nature of the task, rats must choose to cross, step down, or forage at the center of the open field. Three different types of risk assessment behaviors were evaluated at the choice point: (1) hesitation to cross the alley, (2) stretched posture when stepping down, and (3) head dipping to the center of the open field arena. During the conflict crossing task, a hesitation event was counted every time a rat touched, with at least two paws, the acrylic barrier dividing the safe and threat zones (choice point) and returned with its four paws to the safe zone without crossing. During the step-down conflict task, a stretched posture event was counted every time a rat reached the border separating the safe and threat zones (choice point) and elongated its body forward by placing only two paws on the grid and returned back with its four paws into the safe platform. Finally, during the foraging conflict task, head-dipping events were counted every time a rat introduced its head into the border of the threat zone (choice point) and completely returned back to the safe zone (open-field periphery). Data from all experiments were first tested for normality using the one-sample Kolmogorov–Smirnov test. After testing for the normality of data, experimental groups were compared by using, when appropriate, Student's two-tailed *t* tests (paired or unpaired) or analysis of variance (one- or two-way between groups or within-subjects ANOVA) followed by planned comparisons or Tukey's multiple comparisons *post hoc* tests (STATISTICA; StatSoft, United States).

RESULTS

To determine which DZPM dose was appropriate to test the validity of our conflict tasks, we started by evaluating two DZPM doses in two commonly used behavioral assays. We injected rats with DZPM at a low dose (1 mg/kg), a high dose (2 mg/kg), or SAL before open field (**Supplementary Figure 1A**) and beam walking (**Supplementary Figure 1B**) tests. Using one-way ANOVA (followed by *post hoc* tests, below), we found differences between groups in locomotion, motor coordination but not on anxiety-like behavior, as indicated, respectively, by differences on distance traveled [$F_{(2,32)}$: 6.49, $p = 0.004$] and beam walking time [$F_{(2,17)}$: 10.38, $p = 0.001$] but no differences on entries to center [$F_{(2,31)}$: 1.05, $p = 0.359$]. We found that DZPM at a low dose did not affect locomotion, anxiety-like behavior, nor motor coordination, as indicated, respectively, by similar levels of total distance traveled (SAL, 222.9 cm; DZPM, 217.4 cm; $p = 0.98$) and the number of entries to the center of the open field (SAL, 1.94; DZPM, 1.0; $p = 0.444$), as well as similar times to arrive to the end of a narrow elevated beam, as compared to the control group (SAL, 9.6 s; DZPM, 12.8 s; $p = 0.99$). In contrast, rats injected with a high DZPM dose impaired locomotion and motor coordination, without affecting anxiety-like behavior, as indicated by decreased levels of total distance traveled (SAL, 222.9 cm; DZPM, 103.6 cm; $p = 0.004$) and a similar number of entries to the center of the open field (SAL, 1.94; DZPM, 1.1; $p = 0.501$), as well as increased times to arrive at the end of a narrow elevated beam (SAL, 9.6 s; DZPM, 120.7 s; $p = 0.003$), as compared to the control group. Given the impairment effects on locomotion and motor coordination observed after injecting a high dose of DZPM but not after injecting a low dose (low vs. high DZPM doses: distance traveled in open field, $p = 0.023$; beam walking time, $p = 0.004$), we used a low dose of DZPM to test the validity of conflict behaviors in our tasks. Next, we evaluated the effect of this DZPM dose on two types of choice-mediated conflict behaviors in our three conflict tasks: (1) the time it takes rats to successfully confront threats to obtain rewards and (2) the number of times rats displayed risk assessment responses toward the reward site.

Diazepam Facilitated Crossings During Conflict Test Without Affecting No-Conflict Behaviors

The crossing-mediated conflict task is a modified version of a task previously used to map self-stimulation brain sites. In a series of hallmark studies, Olds and Milner (1954) used such a task where the reward after crossing the grid was electrical stimulation. Our task involves natural food reward rather than an electrical reward and the use of discrete learned cues to guide choice behavior. Thus, our task requires that a hungry rat, previously trained to press a lever for food cued by light, crosses an electrified grid to get to reach a lever on the other side of the straight alley that triggers a food dispenser. Our task allows for isolation of key variables in the same individual: appetitive drive indicated by latency to approach in safe no-conflict trials, defensive reactive response indicated by freezing in the “threat”

zone, and competition between aversive and appetitive drives indicated by latency to approach in conflict trials.

To evaluate the effect of DZPM on crossing-mediated conflict behavior at test, rats received conflict training in three consecutive stages: reward and threat trainings, followed by trial discrimination training (**Figure 2A**). Threat and reward training involved associative and crossing sessions. During reward association sessions (6 days), rats confined to one of the ends of the straight alley (“safe” zone) gradually learned that a light cue was associated with the availability of food after pressing a lever, whereas the absence of light was associated with lack of food availability, as indicated by the progressively decreasing lever-pressing levels in no-light trials as compared to stable lever pressing in light trials across training days [two-way repeated-measures ANOVA, group: $F_{(1,26)} = 12.3, p = 0.001$; trial block: $F_{(17,442)} = 6.09, p < 0.001$; interaction: $F_{(17,442)} = 24.0, p < 0.001$]. Notice that reward conditioning shifted an apparent natural preference for lever pressing during the absence of light cue at the beginning of training [day 1, first trial block: light, 7.58; no-light, 11.63 presses/min; Student’s two-tailed paired t test, $t_{(13)} = -2.69, p = 0.018$], to stable pressing preference guided by the light cue at the end of training compared to trials in the absence of light [day 6, session average: light, 10.12; no-light, 4.49 presses/min; Student’s two-tailed paired t test, $t_{(13)} = 7.79, p < 0.001$]. During reward crossing sessions (5 days), the alley was opened to allow for rats to learn to track food availability on opposite ends of the alley guided by the light cue, as indicated by a sustained decrease in time spent to choose to cross the alley (latency) across days [one-way repeated-measures ANOVA, $F_{(14,182)} = 16.4, p < 0.001$]. Notice that rats rapidly learned to cross for food cued by light, as indicated by long latencies at the beginning of training (day 7, first trial block: 20.4 s) as compared to short stable latencies by the end of training [day 11, session average: 8.7 s; Student’s two-tailed paired t test, $t_{(13)} = 6.11, p < 0.001$].

Threat training was initiated 1 day after reward training. During threat association sessions (5 days), rats, confined to the middle of the alley (“threat” zone), were conditioned and tested. Rats rapidly learned to associate noise presentations with shock occurrence, as indicated by increased freezing levels across the first day of conditioning [day 12, Student’s two-tailed paired t test, $t_{(13)} = -5.28, p < 0.001$]. Consistent with this learning, rats showed robust threat memory retrieval elicited by noise in the absence of shock, as indicated by high freezing levels during the test compared to preconditioning baseline levels [day 16, Student’s two-tailed paired t test, $t_{(13)} = -5.23, p < 0.001$]. Between initial conditioning and test, rats exhibited escape-like behaviors as indicated by variable freezing levels (days 13–15). Such threat-elicited behavior reflects the unexpected shock delivery timing during noise presentations (see section “Materials and Methods”) intended to prime active, rather than passive, defensive responses when challenged to cross the alley. Starting the next day, the alley was opened to allow crossings. During threat crossing training (5 days), rats learned to cross to the opposite end of the alley to obtain food despite an electrified grid signaled by noise presentations, as indicated by increased crossing latencies across days [one-way

repeated-measures ANOVA, $F_{(14,182)} = 142.4, p < 0.001$]. By gradually and progressively increasing the duration of time allowed to cross the grid across days (see section “Materials and Methods”), rats learned to limit threat crossing response timing in the choice point, as indicated by short latencies in the beginning (day 17 first trial block: 26.1 s) compared to long latencies at the end of training [day 21 session average: 113.3 s; Student’s two-tailed paired t test, $t_{(13)} = -16.6, p < 0.001$].

These results indicate that, at this point, rats had learned reward and threat contingencies separately. In the final conflict training stage, rats received discrimination training (9 days). Rats learned to distinguish, in the same session, between pseudorandomly presented crossing trials that involved conflict (light and noise presented simultaneously) against those that occurred in the absence of conflict (light without noise), as indicated by increasingly long latencies during conflict and low latencies during no-conflict trials across days [two-way repeated-measures ANOVA, group: $F_{(1,15)} = 34.2, p < 0.001$; trial block: $F_{(26,390)} = 2.72, p < 0.001$; interaction: $F_{(26,390)} = 1.53, p = 0.047$]. Notice that rats started training with similar latencies between trial types [day 22 session trial averages: conflict, 94.0 s vs. no-conflict, 78.8 s; Student’s two-tailed paired t test, $t_{(13)} = -1.66, p = 0.119$] and ended (day 30 session average) with prominently high latencies during conflict trials (81.6 s) as compared to low latencies during no-conflict trials [22.7 s; Student’s two-tailed paired t test, $t_{(13)} = -8.00, p < 0.001$].

To evaluate the effect of DZPM on crossing-mediated conflict behavior at test, rats were separated into two groups matched by similar crossing latencies within trial types and maintained differences between trial types [test, factorial, ANOVA, pre-test, group: $F_{(1,24)} = 0.07, p = 0.787$; trials: $F_{(1,24)} = 20.65, p < 0.001$; interaction: $F_{(1,24)} = 0.076, p = 0.784$] (**Figure 2B**, top). The next day (day 31), rats were tested with 10 crossing trials, in the absence of footshock, after SAL or DZPM injections. Notably, we found that DZPM decreased crossing latencies during conflict test without affecting no-conflict trials, as indicated by low latencies in DZPM-injected rats (23.3 s) compared to long latencies in saline-injected rats (62.6 s) during conflict trials, yet similar latencies between groups during no-conflict trials (DZPM, 14.7 s; SAL, 19.4 s) [test, factorial, ANOVA, test, group: $F_{(1,24)} = 10.6, p = 0.003$; trial block: $F_{(1,24)} = 14.75, p < 0.001$; interaction: $F_{(1,24)} = 6.58, p = 0.016$]. Notice that the DZPM-treated rats crossed as rapidly when conflict was involved as when the conflict was absent, as indicated by similar latencies in conflict as compared to no-conflict trials during test after DZPM injection (23.3 and 14.7 s latencies, respectively; *post hoc* comparison after ANOVA: $p = 0.80$).

In addition to the crossing latencies, we evaluated the effect of DZPM on risk assessment behavior evaluated by the expression of hesitation events in the conflict and no-conflict trials (**Figure 2B**, bottom). Before injection, both saline and DZPM groups showed similarly high numbers of hesitation events in conflict trials and similarly low number of hesitation events during no-conflict trials [pretest, factorial ANOVA, group: $F_{(1,24)} = 0.40, p = 0.53$; trials: $F_{(1,24)} = 137.6, p < 0.000$; interaction: $F_{(1,24)} = 0.80, p = 0.378$]. The next day, after injection, we found that DZPM blocked the expression of hesitation events during the conflict

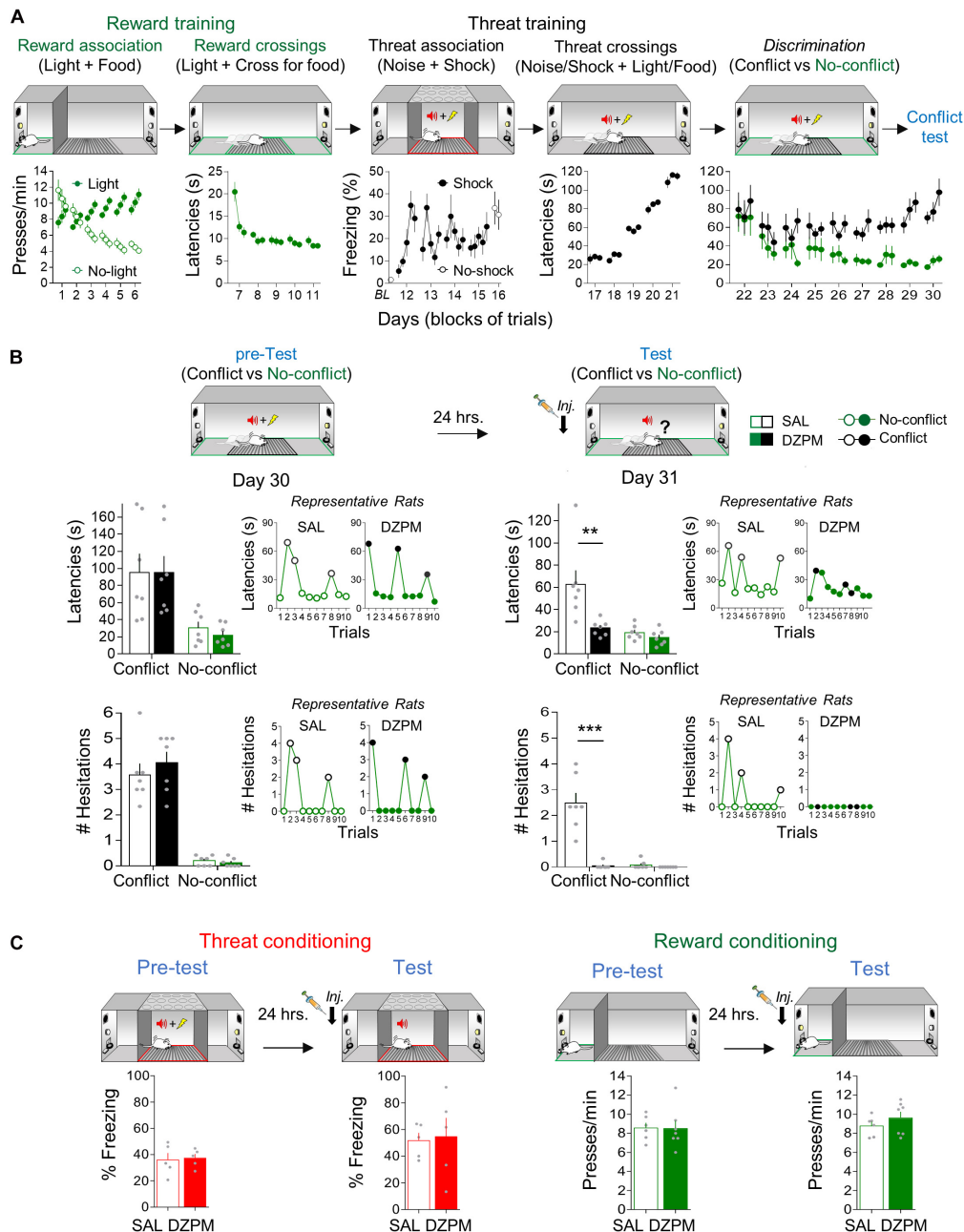


FIGURE 2 | Diazepam decreases crossing latencies and hesitation events during conflict without affecting no-conflict trials. **(A)** Rats acquired crossing-mediated conflict in 30 days ($n = 14$). First, hungry rats, confined to the safe zone (green), learned to associate pressing a lever with food availability cued by a light (reward conditioning), followed by training to cross to the opposite safe zone of the straight alley to obtain food cued by light (no-conflict crossings). Then, rats, confined to the threat zone (grid, red) of the alley, learned to associate the occurrence of white noise with a mild footshock (threat conditioning), followed by training to cross with both learned contingencies (light/food and noise/shock) presented simultaneously (conflict crossings). Finally, rats were trained to discriminate crossing trials guided by no-conflict (light/food alone) or conflict (light/food and noise/shock) cues. Data from lever pressing (per minute) and time to cross to the opposite safe zone of the alley (latency in seconds) are presented in blocks of three trials per day, whereas percent time spent freezing (with or without shock) is presented for each trial. By the end of crossing-mediated conflict training, rats showed high crossing latencies during conflict trials (black) compared to no-conflict trials (green). **(B)** Before injection (pre-test), saline solution and diazepam groups (SAL, $n = 7$; DZPM, $n = 7$) showed similarly high crossing latencies (top) and hesitation events toward the reward site (bottom) during Conflict trials and similarly low crossing latencies and hesitation events during No-conflict (left, trials averages of experimental groups; right, trial by trial performance of representative rats). The following day, after injection (test), the diazepam-treated rats decreased crossing latencies (top) and hesitation events (bottom) during conflict trials (no shock) while leaving no-conflict trials intact, as compared to the saline-treated rats (left, trial averages of experimental groups; right, trial by trial performance of the same representative rats shown in pretest). **(C)** Rats were separately trained in threat and reward conditioning tasks. Before (pre-test) and after (test) injection, SAL and DZPM groups (SAL, $n = 5$; DZPM, $n = 5$) showed similar reactive freezing responses during aversive conditioning and numbers of lever presses per minute during appetitive conditioning (SAL, $n = 6$; DZPM, $n = 7$). Error bars indicate Standard Error of Mean (SEM). BL, baseline. $**p < 0.01$; $***p < 0.001$.

test without affecting no-conflict trials, as indicated by almost a complete lack of hesitation events displayed by DZPM-injected rats (0.047 events) compared to high amount of hesitation events displayed by the saline-injected rats (2.47 events) during conflict trials [test, factorial ANOVA, group: $F_{(1,24)} = 38.42$, $p = 0.000$; trial block: $F_{(1,24)} = 36.36$; $p < 0.000$; interaction: $F_{(1,24)} = 33.58$; $p = 0.000$], yet similar hesitation events between groups during no-conflict trials (DZPM, 0.00 events; SAL, 0.081 events). Thus, consistent with the effect on crossing latencies, although DZPM decreased risk assessment behavior during conflict trials, it did not affect no-conflict trials (0.00 and 0.04 hesitation events, respectively, *post hoc* comparison after ANOVA: $p = 0.99$). Surprisingly, even though DZPM decreased both the crossing latencies and the risk assessment behavior only during conflict trials, these behavioral responses appear to be independent of each other, as indicated by lack of correlation between them in both experimental groups (Pearson correlation test, SAL, $R = 0.49$, $p = 0.25$; DZPM, $R = 0.28$, $p = 0.53$; for example, see rat 3 for lack of direct relationship between latencies and hesitations in **Supplementary Figure 2**). **Figure 2B** insets and **Supplementary Figure 2** show trial by trial performance comparison of individual representative rats before (pre-test) and after (test) injection of either SAL or DZPM, highlighting that DZPM facilitated alley crossings and abolished risk assessment behavior that involves selecting the appropriate choice behavior (approach a reward despite threat) guided by competing aversive and appetitive memories.

To test whether this DZPM effect could be explained by impairment on the expression of threat and/or reward memories independently, we injected SAL or DZPM in separate groups of rats before threat and reward conditioning retrieval tests (**Figure 2C**). Separate groups of rats were subjected to threat conditioning and reward conditioning as above (see section “Threat Association and Reward Association Training”, respectively) and tested for memory retrieval on the last day after injection of either DZPM or SAL. During threat and reward training (pre-test), both saline- and DZPM-injected rats showed similarly high levels of freezing and lever pressing [Student’s two-tailed unpaired t test, $t_{(8)} = -0.21$, $p = 0.83$; $t_{(11)} = 0.06$, $p = 0.95$]. After injection (test), we found that DZPM did not affect threat and reward memory expression, as indicated by similar freezing (DZPM, 57.33; SAL, 51.6% freezing) and lever-pressing levels (DZPM, 8.7; SAL, 9.6 presses/min) compared to their respective saline groups during the retrieval test [Student’s two-tailed unpaired t test, $t_{(8)} = -0.49$, $p = 0.63$; $t_{(11)} = -1.03$, $p = 0.32$]. Finally, we evaluated whether crossing-mediated choice behavior during the conflict test was goal directed or habitual by retraining rats for 3 days, giving rats free access to food for a day and the following day evaluated for crossing behavior. We confirmed that crossing behavior was guided by goals and not by habits, as indicated by maintained trial discrimination but increased latencies in both conflict and no-conflict trials in satiated (conflict trials, 154 s; no-conflict trials, 59 s) vs. no-satiated rats (conflict trials, 64.6 s; no-conflict trials, 17 s) during test [comparison: conflict trials, Student’s two-tailed paired t test, $t_{(13)} = -5.43$, $p < 0.001$, no-conflict trials, Student’s two-tailed paired t test, $t_{(13)} = -684$, $p < 0.001$]. These results indicate that DZPM does not affect threat- and reward-related behaviors

per se but rather facilitates goal-directed conflict behaviors that involve simultaneously occurring threat and reward-predicting stimuli that compete for the selection of the appropriate choice behavior. Thus, taken together, these findings validate our crossing-mediated conflict task by showing that DZPM facilitates the ability of rats to choose to confront learned threats to execute learned motivational responses that lead to obtaining food.

Diazepam Facilitated Step-Down Latencies During Conflict Test Without Affecting No-Conflict Behaviors

Innate stimuli often guide the act of facing threats to obtain rewards. Animals often forage for rewards that possess innate value, such as water and sweet tastes. To study animals seeking an innate reward in the face of a learned threat, we evaluated retrieval of an aversive memory in two variants of the step-down task, conflict (with thirsty rats) and no-conflict (with no-thirsty rats). In the standard step-down avoidance task, rats rapidly learn stepping down from a safe platform that predicts a footshock in an electrified grid floor (Izquierdo et al., 1997). To study conflict behavior, we modified this task by placing a bottle containing naturally preferred sweetened water at the end of the grid, opposite to the safe platform (see section “Materials and Methods”). This task is similar to one recently used to study sucrose-seeking behavior (Nieh et al., 2015) but differs in that: (1) rats are restrained by a sliding door at the choice point to delimit choice-mediated behavior in time and space and (2) the critical test assay occurs in the absence of footshocks to avoid potential pain confounds.

To evaluate step-down avoidance-mediated conflict behavior at test, we compared choice behavior (latencies to step down or not to step down the platform to obtain water with saccharin) in two separate groups of rats. One group of rats received conflict training, while the other group received no-conflict training. Conflict training involves rats motivated to face the learned threat because they are thirsty, whereas no-conflict training involves rats with free access to water (satiated) and therefore were not motivated to step down the safe platform. Both groups of rats received conflict and no-conflict training in two consecutive stages: reward presentation and threat training (**Figure 3A**). During reward presentation (5 days), rats gradually learned that at the end of the grid, there was a bottle of water containing saccharin, as indicated by the progressively decreasing latencies in both conflict [one-way repeated-measures ANOVA, $F_{(1,64)} = 17.63$; $p < 0.001$] and no-conflict training [one-way repeated-measures ANOVA, $F_{(1,44)} = 11.35$; $p < 0.001$]. In a few days, rats familiarized with the box and identified the location of the reward, as indicated by long latencies in the first reward presentation (day 1, conflict training: 284.4 s; day 1, no-conflict training: 463.0 s) as compared to short latencies by the last reward presentation session [day 5, conflict training: 15.5 s; day 5, no-conflict training: 101.0 s; conflict training: Student’s two-tailed paired t test, $t_{(16)} = 4.53$, $p < 0.001$; no-conflict training: $t_{(11)} = 5.04$, $p < 0.001$]. At this point, both groups of rats showed similar step-down latencies to obtain saccharin [Student’s two-tailed unpaired t test, $t_{(27)} = -1.73$, $p = 0.094$].

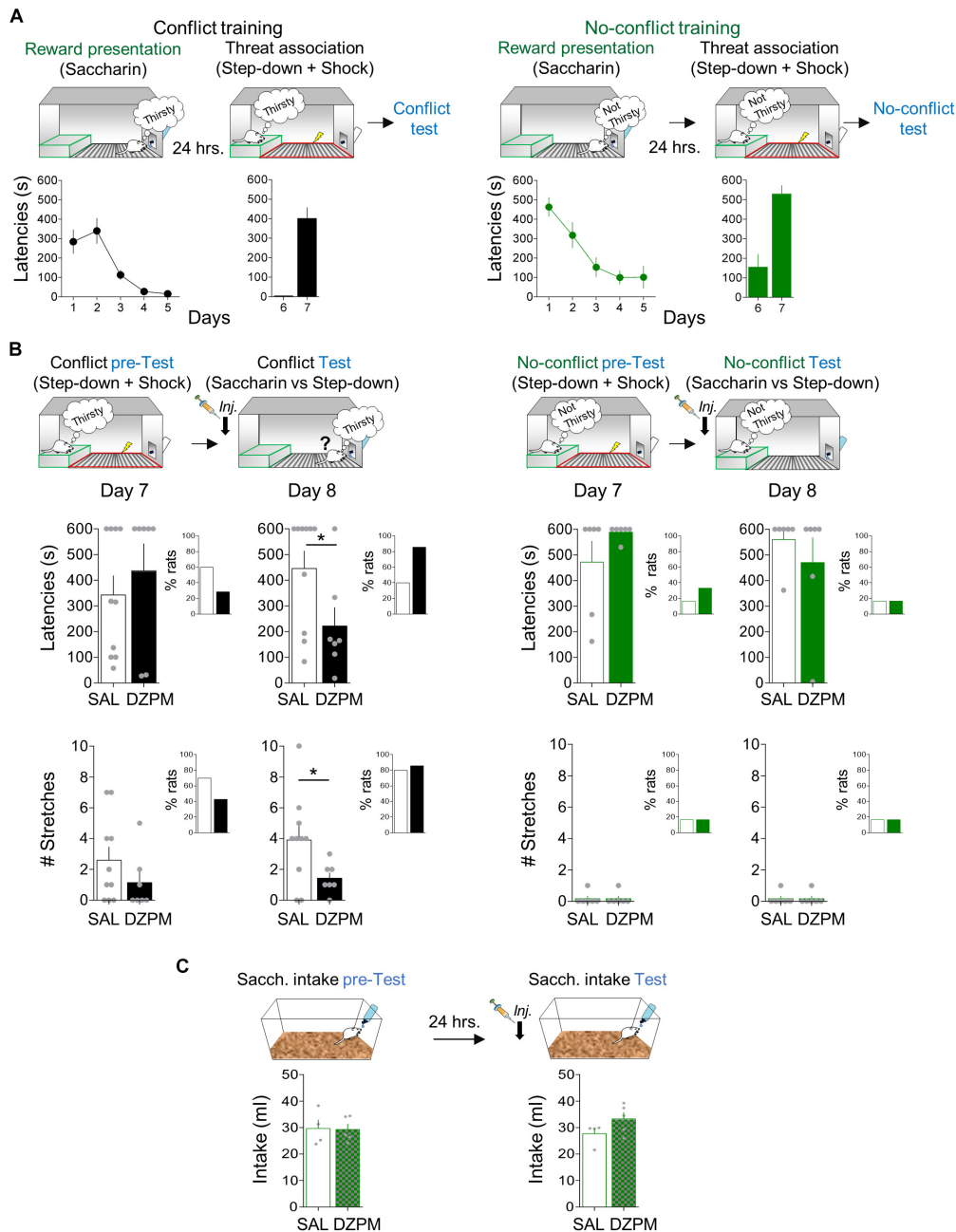


FIGURE 3 | Diazepam decreases step-down latencies and stretched postures during the conflict test without affecting no-conflict conditions. **(A)** Rats acquired step-down avoidance either mediated by conflict or no-conflict. *Left*, In the conflict condition (black), rats ($n = 17$) innately motivated to drink (thirsty) step down from the platform (safe zone, green) to obtain sweetened water (saccharin; reward presentation) from the bottle at the end of the grid, followed by learning that the act of stepping down was associated with the occurrence of a mild footshock in the grid context (threat zone, red). *Right*, In the no-conflict condition (green), rats ($n = 12$) with free access to water (not thirsty) stepped down the platform to obtain saccharin solution, followed by learning that stepping down was associated with footshock delivery in the grid. Time to step down with four paws onto the grid (latency in seconds) is presented by a single trial per day. By the end of the training, both groups showed high latencies to step down. **(B)** Before injection (pre-test), SAL and DZPM groups, in both conflict (*left*, black) and no-conflict (*right*, green) conditions, showed high latencies to step down (top) and stretched postures (stretches, bottom) toward the reward site. The following day, after injection (test), DZPM-treated rats decreased step-down latencies (top) and the numbers of stretches (bottom) during the conflict condition ($n = 7$) without affecting the no-conflict condition ($n = 6$), as compared to the SAL-treated rats ($n = 10$ and $n = 6$, respectively). The inset graphs show the percent of rats that successfully stepped down from the platform to approach the reward [latencies (top) and the rats that displayed stretches (bottom)] during both conflict and no-conflict conditions before (pre-test) and after (test) drug manipulation. **(C)** Rats in their home cages showed similar levels of saccharin intake before (pretest) and after (test) injection of SAL and DZPM (SAL, $n = 4$; DZPM, $n = 5$). Error bars indicate SEM. * $p < 0.05$.

Threat association was initiated 1 day after the reward presentation. During threat association sessions (2 days), rats received a mild footshock in the grid (“threat” zone) immediately after they stepped down from the platform (“safe” zone). Rats rapidly learned to associate the action of stepping down from the platform with footshock occurrence, as indicated by short latencies in the beginning (day 6, conflict training: 4.1 s; day 6, no-conflict training: 154.0 s) compared to long latencies at the end of training in both group of rats [day 7, conflict training: 401.0 s; Student’s two-tailed paired t test, $t_{(16)} = -6.97$, $p < 0.001$; day 7, no-conflict training: 529.9 s; $t_{(11)} = -5.64$, $p < 0.001$]. At this point, rats had associated the step-down response with footshock.

To evaluate the effect of DZPM on step-down avoidance-mediated conflict behavior at test, rats that received conflict or no-conflict training were separated into two groups matched by similar step-down latencies [day 7, pre-test, conflict group: Student’s two-tailed unpaired t test, $t_{(15)} = -0.74$, $p = 0.46$; day 7, pretest, no-conflict group: $t_{(10)} = -1.40$; $p = 0.19$; **Figure 3B**, top]. The next day (day 8), rats were tested in a single trial without footshock after SAL or DZPM injections. Notably, we found that DZPM decreased step-down latencies during the conflict test, as indicated by low latencies in DZPM-injected rats compared with saline-injected rats [SAL, 446.1 s; DZPM, 225.5 s; Student’s two-tailed unpaired t test, $t_{(15)} = 2.2$; $p = 0.043$]. In contrast, DZPM did not affect step-down latencies during no-conflict test, as indicated by similar long latencies in diazepam-injected rats (s) compared with the saline group [SAL, 560.3 s; DZPM, 470.1 s; Student’s two-tailed unpaired t test, $t_{(10)} = 0.85$; $p = 0.41$]. Consistent with the effect of DZPM on step-down latencies, we observed a greater proportion of DZPM-injected rats (85%), as compared to saline-injected rats (40%), that stepped down pursuing reward during the conflict test, while saline- and DZPM-injected rats stepped down similarly (SAL 16.6%; DZPM, 16.6%) during the no-conflict test (**Figure 3B**, top, insets).

In addition to the step-down latencies, we assessed a risk assessment behavior, evaluated by the expression of stretched posture events in the conflict and no-conflict groups (**Figure 3B**, bottom). Before injection (pre-test), both saline and DZPM groups showed similarly high number of stretched posture events during the conflict condition and similarly low number of stretched posture events during no-conflict condition [day7, pre-test, conflict group: Student’s two-tailed unpaired t test, $t_{(15)} = 1.21$, $p = 0.24$, no-conflict group: $t_{(8)} = 0.00$, $p = 1.0$]. Consistent with the step-down latencies, we observed that DZPM decreased the expression of risk assessment behavior during conflict test, as indicated by the lower number of stretched posture events in the DZPM-treated rats as compared with the saline-treated rats [SAL, 3.90 events; DZPM, 1.42 events; Student’s two-tailed unpaired t test, $t_{(15)} = 2.13$, $p = 0.049$] but without increasing the proportion of rats that successfully stepped down pursuing reward (SAL, 80%; DZPM, 85%) (**Figure 3B**, bottom, inset). In contrast, DZPM did not affect the expression of risk assessment behavior in the no-conflict test, as indicated by similarly low numbers of stretched posture events in both saline and DZPM groups [SAL, 0.16 events; DZPM, 0.16; Student’s two-tailed unpaired t test, $t_{(10)} = 0.00$, $p = 1.0$]. Thus, DZPM injection decreased both crossing latencies

and a risk assessment behavior only during the conflict test. Finally, consistent with results from our crossing task, step-down latencies and risk assessment events were not correlated (Pearson correlation test, DZPM, $R = -0.042$, $p = 0.33$; SAL, $R = 0.058$, $p = 0.87$), suggesting two independent choice-related behaviors triggered by conflict.

To further test whether the low DZPM dose effect on conflict behaviors (latencies and hesitation) could be explained by facilitating spontaneous drink seeking, we injected saline or DZPM in a separate group of rats that never received a shock, before a free a saccharin intake test in their home cage (**Figure 3C**). This nonshocked group is important to test whether DZPM affects reward intake by itself (such as tested in the previous task with a lever-pressing test). Before injections (pre-test), both groups showed similar baseline levels of sweetened water intake in their home cages [SAL, 29.67 ml; DZPM, 28.24 ml; Student’s two-tailed unpaired t test, $t_{(7)} = 0.34$, $p = 0.74$]. After injection during (test), we found that DZPM did not increase saccharin intake, as indicated by similar levels of sweetened water consumed compared to the saline-treated group [SAL, 27.7 ml; DZPM, 33.3 ml; Student’s two-tailed unpaired t test, $t_{(7)} = -1.67$, $p = 0.13$]. These results indicate that DZPM decreases step-down avoidance responses (latencies and risk assessment behavior) during conflict without affecting reward-seeking behavior per se). Thus, taken together, these findings validate our step-down avoidance-mediated conflict task by showing that DZPM facilitates the ability of rats to choose to overcome a learned defensive response to actively obtain a naturally preferred reward.

Diazepam Facilitated Innate Foraging Behavior During Conflict Test Without Affecting No-Conflict Behaviors

In nature, foraging behavior often requires that animals overcome the risk of encountering a predator. For example, rodents may be challenged to forage for food in an open field despite the risk of being detected by a flying predator. To study the ability of rodents to face innate threats to obtain food, we evaluated foraging behavior in conflict vs. no-conflict-based open field tests. In the standard open field test, rats explore the periphery of a novel environment (“safe” zone) while innately avoiding the center of the open field arena (“threat” zone) (Prut and Belzung, 2003). To study an overt conflict behavior, we developed a modified version of the open field test by placing food in a brightly lit center arena (see section “Materials and Methods”).

To evaluate innate foraging conflict behavior, we compared open-field behavior (time spent at the center of an open field arena) in two separate groups of rats. One group of rats was exposed to conflict conditions (Conflict), while the other group was exposed to the same environment in the absence of conflict (No-conflict). Conflict test involves food at the center of the open field arena (**Figure 4A**), whereas the no-conflict test does not (**Figure 4B**). To evaluate the effect of DZPM on instinctive foraging conflict behavior, we compared open-field behavior in conflict vs. no-conflict-mediated open field tests after SAL and DZPM injections. We found that DZPM increased foraging behavior for food during conflict test as

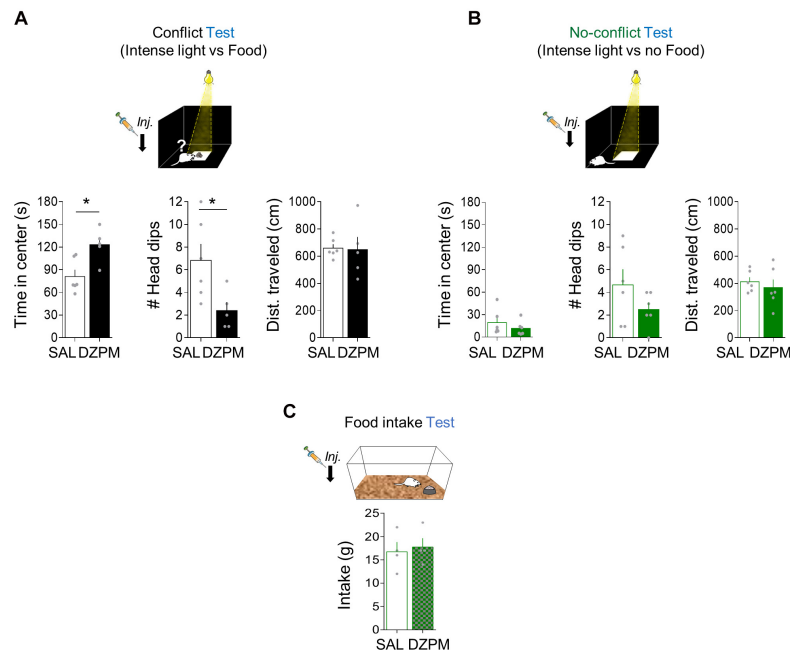


FIGURE 4 | Diazepam increases risky foraging while decreasing head dips during conflict without affecting no-conflict behaviors. Rats placed in an open field arena were tested for innate exploratory behaviors (foraging), head dips (risk assessment), and general locomotion (distance traveled) mediated either by conflict or no-conflict conditions. **(A)** In the foraging-mediated innate conflict test, the diazepam-treated rats spent more time foraging for food (reward) in the brightly illuminated center of the arena (threat zone) while showing low number of head dips events and similar distance traveled in the open field, as compared to the saline group (SAL, $n = 6$; DZPM, $n = 5$). **(B)** In the foraging test where there is no food available (no reward) at the center of the arena (no conflict), time in the brightly illuminated center, head-dip events, and distance traveled were similar in SAL and DZPM groups (SAL, $n = 6$; DZPM, $n = 6$). **(C)** Rats in their home cages showed similar food intake levels after SAL and diazepam injection (SAL, $n = 4$; DZPM, $n = 4$) during the food intake test. Error bars indicate SEM. * $p < 0.05$.

indicated by more time spent at the center of the open field (“threat” zone) in DZPM-injected rats as compared to saline-injected rats [SAL, 81.03 s; DZPM, 123.16 s; Student’s two-tailed unpaired t test, $t_{(9)} = -3.1$, $p < 0.011$]. Similar to the other two tasks described before, we found that DZPM decreased risk assessment behavior during the conflict test, as indicated by less head-dipping events in the DZPM-injected rats as compared to the saline-injected rats [SAL, 6.83 events; DZPM, 2.4 events; Student’s two-tailed unpaired t test, $t_{(9)} = 2.55$, $p < 0.031$]. DZPM effect on conflict test was independent of locomotion behavior, as indicated by similar traveled distance (cm) in the saline- and DZPM-injected rats during the conflict test [SAL, 658.73 cm; DZPM, 648.05 cm; Student’s two-tailed unpaired t test, $t_{(9)} = 0.11$, $p < 0.908$]. Consistent with our previous tasks (crossing and step-down mediated conflict tasks), time spent at the center (threat zone) and head-dipping events (risk assessment) were not correlated (Pearson correlation test, DZPM, $R = -0.70$, $p = 0.11$; SAL, $R = 0.54$, $p = 0.34$), suggesting that these are independent choice behavior variables elicited by conflict. In contrast, DZPM did not affect foraging behavior or general locomotion during the no-conflict test, as indicated by both DZPM - and saline-injected rats spending similar time at the center [SAL, 19.3 s; DZPM, 11.7 s; $t_{(10)} = 0.96$, $p = 0.35$], similarly low head-dipping events [SAL, 4.66 events; DZPM, 2.50 events; $t_{(10)} = -1.43$, $p = 0.18$] and not differences in the traveled distance [SAL, 412.87 cm; DZPM, 369.35 cm; Student’s

two-tailed unpaired t test, $t_{(10)} = 0.64$, $p = 0.53$] in the open-field arena. This DZPM effect on conflict was not due to increased food intake, as indicated by similar food consumed levels compared to the saline group during the test [SAL, 2.25 g; DZPM, 2.20 g; Student’s two-tailed unpaired t test, $t_{(9)} = 1.10$, $p = 0.531$].

To further test whether the low DZPM dose effect could be explained by hyperphagia (Johnson, 1978; Naruse and Ishii, 1995), we injected saline or DZPM in separate groups of rats before the food intake test in their home cage (**Figure 4C**). We found that DZPM did not increase food intake, as indicated by similar levels of food consumed compared to the saline-treated group on the third day of the food intake test [SAL, 16.7 g; DZPM, 17.7 g; Student’s two-tailed unpaired t test, $t_{(6)} = -0.35$, $p = 0.73$]. Consistently, by comparing food intake in the same individual during a drug-free test (day 4) and after the DZPM test (day 5), we found that DZPM did not affect food intake, as indicated by the similar weight of food-containing plates between days [day 4 (without drug), 15.0 g; day 5 (with drug), 17.7 g; Student’s two-tailed unpaired t test, $t_{(3)} = -1.06$, $p = 0.36$]. These results indicate that DZPM increases foraging behavior during conflict without affecting no-conflict behaviors (including feeding). Taken together, these findings validate conflict behavior in our open field-mediated conflict task by showing that DZPM facilitates the ability of rats to choose to confront innate threats to forage for food.

DISCUSSION

We developed three conflict tasks for studying how rodents choose to confront threats to obtain rewards emulating real-life situations. We found that, regardless of whether competing cues were conditioned or innate, DZPM facilitated taking action to face threats by biasing choice toward reward-seeking behaviors during conflict. By using systemic pharmacological manipulations, we show that each of our choice-based tasks are valuable behavioral tools to study conflict behavior. Taken together, our three tasks may be a useful test battery to investigate the underlying brain mechanisms and key neural circuits involved in conflict behaviors associated with facing threats in pursuit of rewards.

Conflict Tasks

Most previous conflict research has focused on cost–benefit decisions that involve choice between reward options (risky large rewards or small safe rewards), delaying or punishing rewards, thereby biasing behavior against risky reward-seeking behavior and toward avoidance responses (Goette et al., 2015; Jean-Richard-Dit-Bressel and McNally, 2015; Orsini et al., 2016; Piantadosi et al., 2017). Conditioned suppression paradigms have been traditionally used to decrease the occurrence of instrumental behavior (e.g., lever pressing) while the unconditioned aversive stimuli (e.g., footshock) is present (Estes and Skinner, 1941). Under this procedure, animals learn to optimally execute lever pressing when the footshock is not present. In contrast, although based on the same principle, our three conflict tasks are set up so that animals learn that they must suppress prepotent defensive behaviors (learned or innate) to face a threat and thereby obtain a reward (i.e., reward the act of confronting threats), thereby biasing choice toward approach behaviors despite avoidance reactions. Together, our three tasks conform a detailed behavioral test battery useful to evaluate conflict choice behaviors. Our test battery involves tasks that evaluate rewarding risky behaviors based on training rats to distinguish between safe and risky locations to execute a choice behavior. Rats can choose between staying in a safe location to avoid a threat or move to risky location and obtain a reward. To obtain rewards, rats must confront threats. One of our tasks involves extensive training to reward risky crossings, another task involves little training to reward risky step-down behavior, and a final task involves innate behaviors that reward risky foraging for food. On each task, levels of conflict are manipulated differently [each task uses different internal states of the animal (hungry or thirsty)], and different sets of stimuli (tone, light, or context) are used to guide conflict behaviors (**Supplementary Table 1**). Each individual task provides limited information regarding effects on conflict, but comparing them with no-conflict conditions and control experiments isolating the different motivational components, the results across tasks provide a comprehensive understanding of how a pharmacological manipulation affects conflict. We showed that all conflict behaviors in our tasks are sensitive to DZPM, without affecting no-conflict responses (reactive freezing responses and reward-seeking behaviors), but other experimental manipulations may help dissociate how the

nature of the stimuli that guide conflict behaviors (learned and/or innate) underlie distinct cortical and/or subcortical computations in the brain.

Conflict tasks that contrast conflict against no-conflict conditions are not common, and a conflict test battery that comprehensively evaluates and contrasts conflict behaviors is lacking. An advantage of our conflict test battery is that each of the individual tasks used in this toolset allows contrasting choice behaviors in conditions that involve conflict with those that occur in the absence of conflict. In our conflict test battery, the conflict against no-conflict comparison and use of discrete learned cues allowed us to isolate the effects of experimental manipulations on conflict behavioral responses in the same individuals (conflict vs. no-conflict trials in the same rats) and across groups of rats (conflict and no-conflict tests in separate groups of rats). Two separate, recently developed, conflict tasks have also focused on comparing of conflict vs. no-conflict conditions. One task involves a single-trial test on a radial maze, which evaluated rats that choose to either enter an arm in a maze that is associated with competing appetitive and aversive continuous contextual cues (conflict) or entering an arm that was not associated with any cued valences (neutral) (Nguyen et al., 2015). Unlike this task, our crossing-mediated conflict test involves discriminating between discretely timed cues across several trials that involve conflict from those that do not, which may be useful to record the precise timing of changes in neuronal activity with respect to choice behavior (choice point) where animals must commit to suppress defensive responses (or not) to obtain food. A second conflict task that contrasts conflict with no-conflict conditions focused on the expression of freezing defensive response during reward availability (conflict trials) compared to neutral trials (no-conflict) (Burgos-Robles et al., 2017). Unlike this task, our tasks focus on active (rather than passive) suppression of defensive responses to obtain rewards during the conflict, which simulates real-life challenges more readily than other tasks (facing threats driven by foraging behavior). In addition, contrasted with predator-based conflict models (Choi and Kim, 2010; Kimm and Choi, 2018; Walters et al., 2019), the use of discrete conditioned signals in the crossing-mediated conflict task allows precise timing of choice behaviors triggered by threat and reward cues. Taken together, our behavioral test battery (composed of our three tasks and control experiments) allow for the separation of discrete variables controlling behavior in a drive competition setting in the same individual (separation of crossing behaviors that involve conflict and those that lack conflict) or in separate groups of animals (step-down avoidance memory and foraging behaviors mediated by conflict or lack of conflict). Thus, our conflict test battery may represent a valuable tool to comprehensively study the key brain mechanisms that allow animals to seek rewards despite threats.

Diazepam During Conflict Tests

Because conflict is given by the nature of the tasks in which the risky reward approach is pitted against safety seeking, animals engage in both reward-seeking and threat-elicited behaviors, such that there must be a system that balances these two competing drives (Gray, 1982; McNaughton and Corr, 2014). Perhaps not

as common as skewed conflict resolution behaviors (reactive freezing, pure approach, or pure avoidance), intermediate levels of competition between opposing drives involve optimal conflict appraisal (Corr, 2013), which are sensitive to anxiolytic drugs (Gray, 1977, 1982). These intermediate conflict levels take more computational time and are reflected by risky approach behaviors at the choice point as evaluated in this study. DZPM injection, in all of our tasks, allowed rats to reach their goal faster (i.e., to obtain rewards) and with less vacillation to deliberate on the decision to make (i.e., to confront threats). Yet, because these two choice behaviors (goal-directed choice response and decision after risk assessment) appear to be independent from each other, further studies are necessary to understand how conflict elicited by threats influences different goal-directed choice behaviors.

Our finding that DZPM facilitates confronting threats to obtain rewards is consistent with the notion that this benzodiazepine reduces threat-related responses in overt conflict with reward-seeking behaviors. Previous conflict works have shown that DZPM increases: time spent in the open arms of elevated plus maze (Rex et al., 1996; Chaouloff et al., 1997; Dalvi and Rodgers, 1999), time spent at the center of an open field that includes food (Britton and Britton, 1981; Bodnoff et al., 1989; Rex et al., 1996), time spent in an illuminated but not a dark compartment (Chaouloff et al., 1997), foraging behavior (Walters et al., 2019), as well as increased rates of punished reward responding (Vogel et al., 1971; Paterson and Hanania, 2010) and conditioned suppression during conflict (Kilts et al., 1981; Commissaris and Rech, 1982). Engaging in a situation that is simultaneously threatening and rewarding leads to increased physiological arousal (Barker et al., 2019), which may represent an aversive signal (Dreisbach and Fischer, 2012) and thereby induce anxiety. Thus, previous results along with our present findings using conflict tests are consistent with the notion that DZPM may reduce the inability to engage in reward-seeking behaviors (reduce behavioral inhibition) possibly by reducing the increase in arousal that is associated with conflict (“anticonflict effect”) (Liljequist and Engel, 1984; Pericic and Pivac, 1996; Rowlett et al., 2006), thereby allowing the individual to reach their goal. Such anticonflict effect of DZPM on behavioral inhibition has been theorized to represent an effect on a core component of anxiety (Gray, 1977, 1982).

Although the anticonflict effect has been interpreted also as anxiolytic effect (anxiety reducing) (Ljungberg et al., 1987; Beck and Fibiger, 1995), we found that a low dose of DZPM distinctly affects choice behavior during conflict while leaving no-conflict behaviors intact (including anxiety-like behaviors, locomotion, motor coordination, lever pressing, feeding and drinking intake, or reactive freezing defensive responses). Our findings are consistent with the notion, based on varying levels of threat imminence (distance to threat), that conflict behaviors are sensitive to anxiolytic drugs while no-conflict behaviors are not (McNaughton and Corr, 2004). Urgent responses to threats elicit reactive behaviors that are not responsive to anxiolytics, whereas not urgent responses to threats elicit risk-assessment behaviors that are responsive to antianxiety drugs. Our DZPM effect exclusively on conflict contingencies suggests that this drug reduces the probability of engaging predominant, but not

urgent, threat-related behaviors only when conflict with reward stimuli is involved. Furthermore, this DZPM effect on conflict behaviors may be most effective at reducing anxiety elicited by anticipation of potential threats (anticipatory anxiety) specifically related to the decision that emerges when confronting threats. In our tasks, challenging rats to confront threats to obtain a reward may induce such an anxiety core component that is triggered by conflict behavior at the choice point and reduced by DZPM. Thus, our findings support the idea that DZPM may have an anticonflict effect by reducing the anxiety triggered by conflict and highlight the possibility of dissociating anxiety related to conflict and no-conflict choice situations.

Behavioral Strategies to Face Threats

Facing threats to obtain a reward may involve suppressing distinct defensive response strategies in pursuit of a goal. Prior work on suppression of defensive responses has focused on extinction of threat, a passive process (Sotres-Bayon and Quirk, 2010). However, the passive suppression that occurs in extinction is slow and temporary. Threat extinction can take hours to days to reach low (preconditioning) defensive response levels. Once defensive responses to threats have extinguished, behavioral responses triggered by threat can readily return (relapse) with the passage of time (spontaneous recovery), change in context (renewal), or a harmful reminder (reinstatement) (Bouton, 2004). This has led to the investigation of alternative approaches to study regulation of different defensive strategies to face threats (Bravo-Rivera and Sotres-Bayon, 2020). One option is to study the active (rather than passive) goal-directed suppression of defensive responses when facing threats. Novel behavioral paradigms in animals are required to understand the neurobiology of using rewards as incentives to face threats. Moreover, conflict work may benefit from a detailed test battery to evaluate conflict behaviors. In the three main tasks included in our conflict test battery, rats must quickly suppress defensive responses triggered by threats (conditioned or innate) to obtain a reward. Thus, our tasks represent a useful detailed toolset to study how rats actively and rapidly take action to confront threats in pursuit of rewards.

Humans occasionally must face threats by carrying out a voluntary action to achieve a goal. Although such an “act of courage” representing a goal-directed decision to face adverse events is critical for survival and mental health, their underlying neural circuits are barely known. Notably, a study in humans showed that the prefrontal and the temporal lobe (including the amygdala) are involved in voluntarily confronting fear of an approaching snake (Nili et al., 2010). In line with this, previous studies in humans suggest that the use of different voluntary cognitive coping strategies to inhibit fear (e.g., reappraisal) engage the same prefrontal–amygdala pathway and additional structures like the striatum and hippocampus (Hartley and Phelps, 2010). However, due to the limitations of research in humans, these studies are not able to identify specific neural circuits and mechanisms involved in this type of behavioral strategy to face threats. Ongoing studies in our laboratory, using the tasks validated here, are beginning to reveal prefrontal and subcortical (including amygdala and striatum) brain circuits necessary to choose to face threats when rewards are available

during approach/avoidance conflict tests (Hernandez-Jaramillo and Sotres-Bayon, 2018; Illescas-Huerta et al., 2018). Further studies in animal models and humans are required to reveal the neural underpinnings of the ability to use goals as incentives to face adversities, which would explain an important facet of human behavior and may help treat psychiatric disorders characterized by deficits in emotional regulation.

Clinical Implications

Combining our conflict test battery with pharmacological interventions may help find new approaches to treat mental disorders in humans characterized by deficits in decision-making in the face of conflicting emotional information. Our findings in rats suggest that a single low dose of DZPM decreases anticipatory anxiety, thereby increasing decision-making confidence to approach goals in the face of threats during conflict situations only. In humans, experiencing conflicting emotions can trigger excessive anticipatory anxiety, which is commonly accompanied by low confidence in daily decisions (Botvinick et al., 2001; Mechias et al., 2010; Goette et al., 2015; Raio et al., 2017). DZPM is one of the most widely used anxiolytic (antianxiety) drugs used by humans. Thus, our findings in rats are consistent with the notion that clinical use of an acute low dose of DZPM in humans is most effective at temporarily treating core symptoms of anxiety disorders. We suggest that such an anxiolytic effect may be specific to conflict-elicited anxiety and that it may act by increasing confidence to decide in anticipation to potentially adverse events [without altering impulsiveness (Reynolds et al., 2004)] allowing individuals to reach goals such as social competitiveness (van der Kooij et al., 2018) or psychotherapy treatment (Watanabe et al., 2007).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Institutional Animal Care and Use Committee of the Universidad Nacional Autónoma de México.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

EI-H, LR-L, ROS, and FS-B: conceptualization and methodology. JAQ and FS-B: resources. FS-B: supervision and funding acquisition. EI-H, LR-L, and ROS: investigation. EI-H, LR-L, and FS-B: writing—original draft. EI-H, LR-L, ROS, JAQ, and FS-B: writing—review and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Grant PN2463), as well as by the 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 FS-B. EI-H is a doctoral student at Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas at UNAM, and was supported by a CONACyT fellowship (736773).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Christian Bravo-Rivera for comments on the manuscript and Sotres-Bayon laboratory members for helpful discussions.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2021.645769/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | A low, but not a high, dose of diazepam leaves locomotion and motricity levels intact. Two diazepam doses (1 and 2 mg/kg) were injected in rats to evaluate effects on anxiety-like behavior and locomotion in the open field test and motricity in the beam walking test. **(A)** Rats injected with either 1 mg/kg (low dose, $n = 8$) or 2 mg/kg (high dose, $n = 9$) doses of diazepam (DZPM) showed a similar number of entries to the center of the open field test than rats injected with saline solution (SAL, $n = 17$). Rats injected with a high dose of diazepam showed decreased distance traveled in the open field test, whereas rats injected with a low dose of diazepam showed similar distances traveled as compared to the saline solution group. **(B)** Rats injected with a high dose of diazepam ($n = 8$) showed increased time to arrive at the end of the walking beam, whereas rats injected with a low dose of diazepam ($n = 6$) showed similar times as compared to the saline solution group ($n = 6$). Error bars indicate SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Supplementary Figure 2 | Trial by trial examples of rats before and after injections in the crossing-mediated conflict task. **(A)** Before the injection (pre-test) saline- (SAL: Rat #1, Rat #2, and Rat#3) and diazepam-treated (DZPM: Rat #4, Rat #5, and Rat #6) rats showed similarly high crossing latencies (s) (top) and hesitation events (bottom) during the Conflict trials (black) and similarly low latencies (s) (top) and hesitation events (bottom) during the No-conflict trials (green). **(B)** Notice that after injection (Test), the diazepam-treated rats dramatically reduced crossing latencies (top) and abolished the expression of hesitation events (bottom) during conflict conditions without affecting No-conflict trials, whereas the performance of the saline-treated rats is similar to pre-test.

Supplementary Table 1 | Conflict test battery. Stimuli, conditions, and apparatus used for each of the individual conflict tasks. Together these tasks constitute the behavioral test battery to study how animals confront threats to pursue rewards. In the crossing-mediated conflict task, hungry rats guided by learned aversive and appetitive cues (in a multi trial two-way straight alley), choose to seek sucrose pellets despite the threat. In the step-down mediated conflict task, thirsty rats guided by a learned aversive stimulus and an innate appetitive stimulus (in a single trial one-way chamber), choose to seek sweetened water despite the threat. In the foraging-mediated conflict task, hungry rats guided by innate aversive and appetitive stimuli (in an open field arena), choose to seek sucrose pellets despite the threat.

REFERENCES

- Amir, A., Lee, S. C., Headley, D. B., Herzallah, M. M., and Pare, D. (2015). Amygdala signaling during foraging in a hazardous environment. *J. Neurosci.* 35, 12994–13005. doi: 10.1523/jneurosci.0407-15.2015
- Barker, T. V., Buzzell, G. A., and Fox, N. A. (2019). Approach, avoidance, and the detection of conflict in the development of behavioral inhibition. *New Ideas Psychol.* 53, 2–12. doi: 10.1016/j.newideapsych.2018.07.001
- Beck, C. H. M., and Fibiger, H. C. (1995). Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate-early gene C-Fos – with and without Diazepam pretreatment. *J. Neurosci.* 15, 709–720. doi: 10.1523/jneurosci.15-01-00709.1995
- Bodnoff, S. R., Suranicadotte, B., Quirion, R., and Meaney, M. J. (1989). A comparison of the effects of Diazepam versus several typical and atypical anti-depressant drugs in an animal-model of anxiety. *Psychopharmacology* 97, 277–279. doi: 10.1007/bf00442264
- Botvinick, M. M., Braver, T. S., Barch, D. M., Carter, C. S., and Cohen, J. D. (2001). Conflict monitoring and cognitive control. *Psychol. Rev.* 108, 624–652.
- Bouton, M. E. (2004). Context and behavioral processes in extinction. *Learn. Mem.* 11, 485–494. doi: 10.1101/lm.78804
- Bravo-Rivera, C., Roman-Ortiz, C., Brignoni-Perez, E., Sotres-Bayon, F., and Quirk, G. J. (2014). Neural structures mediating expression and extinction of platform-mediated avoidance. *J. Neurosci.* 34, 9736–9742. doi: 10.1523/jneurosci.0191-14.2014
- Bravo-Rivera, C., and Sotres-Bayon, F. (2020). From isolated emotional memories to their competition during conflict. *Front. Behav. Neurosci.* 14:36. doi: 10.3389/fnbeh.2020.00036
- Britton, D. R., and Britton, K. T. (1981). A sensitive open-field measure of anxiolytic drug activity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15, 577–582. doi: 10.1016/0091-3057(81)90212-4
- Burgos-Robles, A., Kimchi, E. Y., Izadmehr, E. M., Porzenheim, M. J., Ramos-Guasp, W. A., Nieh, E. H., et al. (2017). Amygdala inputs to prefrontal cortex guide behavior amid conflicting cues of reward and punishment. *Nat. Neurosci.* 20, 824–835. doi: 10.1038/nn.4553
- Calhoun, G. G., and Tye, K. M. (2015). Resolving the neural circuits of anxiety. *Nat. Neurosci.* 18, 1394–1404. doi: 10.1038/nn.4101
- Cardinal, R. N., Parkinson, J. A., Hall, J., and Everitt, B. J. (2002). Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 321–352. doi: 10.1016/s0149-7634(02)00007-6
- Chaouloff, F., Durand, M., and Mormede, P. (1997). Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. *Behav. Brain Res.* 85, 27–35. doi: 10.1016/s0166-4328(96)00160-x
- Choi, E. A., Jean-Richard-Dit-Bressel, P., Clifford, C. W. G., and McNally, G. P. (2019). Paraventricular Thalamus controls behavior during motivational conflict. *J. Neurosci.* 39, 4945–4958. doi: 10.1523/jneurosci.2480-18.2019
- Choi, J. S., and Kim, J. J. (2010). Amygdala regulates risk of predation in rats foraging in a dynamic fear environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 21773–21777. doi: 10.1073/pnas.1010079108
- Commissaris, R. L., and Rech, R. H. (1982). Interactions of metergoline with diazepam, quipazine, and hallucinogenic drugs on a conflict behavior in the rat. *Psychopharmacology* 76, 282–285. doi: 10.1007/bf00432562
- Corr, P. J. (2013). Approach and avoidance behaviour: multiple systems and their interactions. *Emot. Rev.* 5, 285–290. doi: 10.1177/1754073913477507
- Dalvi, A., and Rodgers, R. J. (1999). Behavioral effects of diazepam in the murine plus-maze: flumazenil antagonism of enhanced head dipping but not the disinhibition of open-arm avoidance. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 62, 727–734. doi: 10.1016/s0091-3057(98)00220-2
- Dreisbach, G., and Fischer, R. (2012). Conflicts as aversive signals. *Brain Cogn.* 78, 94–98. doi: 10.1016/j.bandc.2011.12.003
- Estes, W. K., and Skinner, B. F. (1941). Some quantitative properties of anxiety. *J. Exp. Psychol.* 29, 390–400. doi: 10.1037/h0062283
- Friedman, A., Homma, D., Gibb, L. G., Amemori, K. I., Rubin, S. J., Hood, A. S., et al. (2015). A corticostriatal path targeting striosomes controls decision-making under conflict. *Cell* 161, 1320–1333. doi: 10.1016/j.cell.2015.04.049
- Goette, L., Bendahan, S., Thoresen, J., Hollis, F., and Sandi, C. (2015). Stress pulls us apart: anxiety leads to differences in competitive confidence under stress. *Psychoneuroendocrinology* 54, 115–123. doi: 10.1016/j.psycheneu.2015.01.019
- Goldstein, L. B., and Davis, J. N. (1990). Post-lesion practice and amphetamine-facilitated recovery of beam-walking in the rat. *Restor. Neurol. Neurosci.* 1, 311–314. doi: 10.3233/rnn-1990-1501
- Grant, E. C., and Mackintosh, J. H. (1963). A comparison of the social postures of some common laboratory rodents. *Behaviour* 21, 246–259. doi: 10.1163/156853963x00185
- Gray, J. A. (1977). “Drug effects on fear and frustration: possible limbic site of action of minor tranquilizers,” in *Drugs, Neurotransmitters, and Behavior. Handbook of Psychopharmacology*, eds S. D. Iversen, L. L. Iversen, and S. H. Snyder (Boston, MA: Springer).
- Gray, J. A. (1982). *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry Into the Functions of the Septo-Hippocampal System*. New York, NY: Clarendon Press.
- Hartley, C. A., and Phelps, E. A. (2010). Changing fear: the neurocircuitry of emotion regulation. *Neuropsychopharmacology* 35, 136–146. doi: 10.1038/npp.2009.121
- Hayden, B. Y., and Walton, M. E. (2014). Neuroscience of foraging. *Front. Neurosci.* 8:81. doi: 10.3389/fnins.2014.00081
- Hernandez-Jaramillo, A., and Sotres-Bayon, F. (2018). *Basolateral Amygdala, But Not the Orbitofrontal Cortex, is Necessary for Motivational Conflict Responses Guided by Previous Experiences*. San Diego, CA: Society for Neuroscience.
- Hu, H. (2016). Reward and aversion. *Annu. Rev. Neurosci.* 39, 297–324.
- Illescas-Huerta, E., Ramirez-Lugo, L., Ordoñez-Sierra, R., and Sotres-Bayon, F. (2018). *Prelimbic Prefrontal Cortex is Necessary to Face Threats During a Motivational Conflict Guided by Learned, But Not Innate, Stimuli*. San Diego, CA: Society for Neuroscience.
- Izquierdo, I., Quilfeldt, J. A., Zanatta, M. S., Quevedo, J., Schaeffer, E., Schmitz, P. K., et al. (1997). Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur. J. Neurosci.* 9, 786–793. doi: 10.1111/j.1460-9568.1997.tb01427.x
- Jean-Richard-Dit-Bressel, P., and McNally, G. P. (2015). The role of the basolateral amygdala in punishment. *Learn. Mem.* 22, 128–137. doi: 10.1101/lm.035907.114
- Johnson, D. N. (1978). Effect of diazepam on food-consumption in rats. *Psychopharmacology* 56, 111–112. doi: 10.1007/bf00571417
- Kilts, C. D., Commissaris, R. L., and Rech, R. H. (1981). Comparison of anti-conflict drug effects in three experimental animal models of anxiety. *Psychopharmacology (Berl.)* 74, 290–296. doi: 10.1007/bf00427112
- Kimm, S., and Choi, J. S. (2018). Sensory and motivational modulation of immediate and delayed defensive responses under dynamic threat. *J. Neurosci. Methods* 307, 84–94. doi: 10.1016/j.jneumeth.2018.06.023
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 155–184. doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.155
- Liljequist, S., and Engel, J. A. (1984). The effects of GABA and benzodiazepine receptor antagonists on the anti-conflict actions of diazepam or ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 21, 521–525. doi: 10.1016/s0091-3057(84)80033-7
- Ljungberg, T., Lidfors, L., Enquist, M., and Ungerstedt, U. (1987). Impairment of decision making in rats by diazepam: implications for the “anticontact” effects of benzodiazepines. *Psychopharmacology (Berl.)* 92, 416–423.
- McNaughton, N., and Corr, P. J. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 285–305. doi: 10.1016/j.neubiorev.2004.03.005
- McNaughton, N., and Corr, P. J. (2014). Approach, avoidance, and their conflict: the problem of anchoring. *Front. Syst. Neurosci.* 8:124. doi: 10.3389/fnsys.2014.00124
- Mechias, M. L., Etkin, A., and Kalisch, R. (2010). A meta-analysis of instructed fear studies: implications for conscious appraisal of threat. *Neuroimage* 49, 1760–1768. doi: 10.1016/j.neuroimage.2009.09.040
- Miller, N. E. (1944). “Experimental studies of conflict,” in *Personality and the Behavior Disorders*, ed. J. M. Hunt (Oxford: Ronald Press), 431–465.
- Miller, S. M., Marcotulli, D., Shen, A., and Zweifel, L. S. (2019). Divergent medial amygdala projections regulate approach-avoidance conflict behavior. *Nat. Neurosci.* 22, 565–575. doi: 10.1038/s41593-019-0337-z
- Mobbs, D., Trimmer, P. C., Blumstein, D. T., and Dayan, P. (2018). Foraging for foundations in decision neuroscience: insights from ethology. *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 419–427. doi: 10.1038/s41583-018-0010-7

- Moscarello, J. M., and LeDoux, J. E. (2013). Active avoidance learning requires prefrontal suppression of amygdala-mediated defensive reactions. *J. Neurosci.* 33, 3815–3823. doi: 10.1523/jneurosci.2596-12.2013
- Naruse, T., and Ishii, R. (1995). Relationship between histamine receptors in the brain and diazepam-induced hyperphagia in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 51, 923–927. doi: 10.1016/0091-3057(95)00081-7
- Nguyen, D., Schumacher, A., Erb, S., and Ito, R. (2015). Aberrant approach-avoidance conflict resolution following repeated cocaine pre-exposure. *Psychopharmacology (Berl.)* 232, 3573–3583. doi: 10.1007/s00213-015-4006-y
- Nieh, E. H., Matthews, G. A., Allsop, S. A., Presbrey, K. N., Leppla, C. A., Wichmann, R., et al. (2015). Decoding neural circuits that control compulsive sucrose seeking. *Cell* 160, 528–541. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.003
- Nili, U., Goldberg, H., Weizman, A., and Dudai, Y. (2010). Fear thou not: activity of frontal and temporal circuits in moments of real-life courage. *Neuron* 66, 949–962. doi: 10.1016/j.neuron.2010.06.009
- Olds, J., and Milner, P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 47, 419–427. doi: 10.1037/h0058775
- Orsini, C. A., Willis, M. L., Gilbert, R. J., Bizon, J. L., and Setlow, B. (2016). Sex differences in a rat model of risky decision making. *Behav. Neurosci.* 130, 50–61. doi: 10.1037/bne0000111
- Paterson, N. E., and Hanania, T. (2010). The modified Geller-Seifter test in rats was insensitive to GABAB receptor positive modulation or blockade, or 5-HT1A receptor activation. *Behav. Brain Res.* 208, 258–264. doi: 10.1016/j.bbr.2009.12.006
- Pericic, D., and Pivac, N. (1996). Effects of diazepam on conflict behaviour and on plasma corticosterone levels in male and female rats. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 353, 369–376.
- Piantadosi, P. T., Yeates, D. C. M., Wilkins, M., and Floresco, S. B. (2017). Contributions of basolateral amygdala and nucleus accumbens subregions to mediating motivational conflict during punished reward-seeking. *Neurobiol. Learn. Mem.* 140, 92–105. doi: 10.1016/j.nlm.2017.02.017
- Prut, L., and Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3–33. doi: 10.1016/s0014-2999(03)01272-x
- Raio, C. M., Hartley, C. A., Oredoru, T. A., Li, J., and Phelps, E. A. (2017). Stress attenuates the flexible updating of aversive value. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 11241–11246. doi: 10.1073/pnas.1702565114
- Rangel, A., Camerer, C., and Montague, P. R. (2008). A framework for studying the neurobiology of value-based decision making. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 545–556. doi: 10.1038/nrn2357
- Rex, A., Stephens, D. N., and Fink, H. (1996). "Anxiolytic" action of diazepam and abecarnil in a modified open field test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 53, 1005–1011. doi: 10.1016/0091-3057(95)02121-3
- Reynolds, B., Richards, J. B., Dassinger, M., and De Wit, H. (2004). Therapeutic doses of diazepam do not alter impulsive behavior in humans. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 79, 17–24. doi: 10.1016/j.pbb.2004.06.011
- Rodgers, R. J., Cao, B. J., Dalvi, A., and Holmes, A. (1997). Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30, 289–304. doi: 10.1590/s0100-879x1997000300002
- Rowlett, J. K., Lelas, S., Tornatzky, W., and Licata, S. C. (2006). Anti-conflict effects of benzodiazepines in rhesus monkeys: relationship with therapeutic doses in humans and role of GABAA receptors. *Psychopharmacology (Berl.)* 184, 201–211. doi: 10.1007/s00213-005-0228-8
- Schmitt, U., and Hiemke, C. (1998). Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59, 807–811. doi: 10.1016/s0091-3057(97)00502-9
- Schumacher, A., Villaruel, F. R., Ussling, A., Riaz, S., Lee, A. C. H., and Ito, R. (2018). Ventral hippocampal CA1 and CA3 differentially mediate learned approach-avoidance conflict processing. *Curr. Biol.* 28, 1318–1324.e4.
- Sotres-Bayon, F., and Quirk, G. J. (2010). Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 231–235. doi: 10.1016/j.conb.2010.02.005
- Stefanski, R., Palejko, W., Kostowski, W., and Plaznik, A. (1992). The comparison of benzodiazepine derivatives and serotonergic agonists and antagonists in two animal models of anxiety. *Neuropharmacology* 31, 1251–1258. doi: 10.1016/0028-3908(92)90053-r
- Takeda, H., Tsuji, M., and Matsumiya, T. (1998). Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 350, 21–29. doi: 10.1016/s0014-2999(98)00223-4
- Tye, K. M. (2018). Neural circuit motifs in valence processing. *Neuron* 100, 436–452. doi: 10.1016/j.neuron.2018.10.001
- van der Kooij, M. A., Hollis, F., Lozano, L., Zalachoras, I., Abad, S., Zanoletti, O., et al. (2018). Diazepam actions in the VTA enhance social dominance and mitochondrial function in the nucleus accumbens by activation of dopamine D1 receptors. *Mol. Psychiatry* 23, 569–578. doi: 10.1038/mp.2017.135
- Verharen, J. P. H., Van Den Heuvel, M. W., Luijendijk, M., Vanderschuren, L., and Adan, R. A. H. (2019). Corticolimbic mechanisms of behavioral inhibition under threat of punishment. *J. Neurosci.* 39, 4353–4364. doi: 10.1523/jneurosci.2814-18.2019
- Vogel, J. R., Beer, B., and Clody, D. E. (1971). A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacologia* 21, 1–7. doi: 10.1007/bf00403989
- Walsh, R. N., and Cummins, R. A. (1976). The open-field test: a critical review. *Psychol. Bull.* 83, 482–504. doi: 10.1037/0033-2909.83.3.482
- Walters, C. J., Jubran, J., Sheehan, A., Erickson, M. T., and Redish, A. D. (2019). Avoid-approach conflict behaviors differentially affected by anxiolytics: implications for a computational model of risky decision-making. *Psychopharmacology (Berl.)* 236, 2513–2525. doi: 10.1007/s00213-019-05197-0
- Watanabe, N., Churchill, R., and Furukawa, T. A. (2007). Combination of psychotherapy and benzodiazepines versus either therapy alone for panic disorder: a systematic review. *BMC Psychiatry* 7:18. doi: 10.1186/1471-244X-7-18

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Illescas-Huerta, Ramirez-Lugo, Sierra, Quillfeldt and Sotres-Bayon. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.