



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE C-FOS EN LA AMÍGDALA Y EL
HIPOCAMPO EN CONDICIONES DE ENTRENAMIENTO AVERSIVO INTENSO Y
MODERADO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

CLYO XUNAXI RUIZ LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. ROBERTO AGUSTÍN PRADO ALCALÁ

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR

DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

DR. CAROLINA ESCOBAR BRIONES

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

QUERÉTARO, QRO. 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Instituto de Neurobiología (INB) por todo el apoyo dado para mi desarrollo académico.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por auspiciar el proyecto de investigación número 237570, así como por haberme concedido la beca de Doctorado número 304833 y al programa de Apoyos Complementarios para Mujeres Indígenas Becarias CONAHCYT por el equipo de cómputo que me otorgaron.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-PAPIIT), por auspiciar el proyecto de investigación IN205222.

Al Doctorado en Ciencias Biomédicas, en especial a la Dra. Aurea Orozco, al Dr. Reyes Haro y a la Dra. Yolanda Irasema Chirino López, por toda su paciencia en este proceso que en algún momento llegó a hacerse muy caótico.

A la Unidad de Enseñanza y Posgrado, en especial a Carmen Mendoza López, Leonor Casanova Rico y a la Dra. Nuri Aranda López por la colaboración y apoyo otorgados durante mis estudios de Doctorado.

A los integrantes del jurado: Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda, Dra. Violeta Gisselle López Huerta, Dr. Luis Oskar Soto Rojas y Dr. Miguel Ángel Pérez de la Mora, por su revisión del trabajo y atinadas sugerencias para mejorarlo.

A la Unidad de Microscopía, en especial a la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos, por su buena disposición para permitirme hacer uso de las instalaciones de esa Unidad.

A la Unidad de Proteogenómica, en especial a la M. en C. Adriana González Gallardo, por permitirme hacer uso de las instalaciones.

A los responsables del Bioterio, M.V.Z. José Martín García Servín y Dra. Alejandra Castilla León.

A la Unidad de Videoconferencia. María de Lourdes Lara Ayala†, Sandra Hernández García y Mtro. Moisés Mendoza Baltazar.

A la Unidad de Cómputo. Ing. Ramón Martínez Olvera, Ing. Omar González Hernández e Ing. María Eugenia Rosas Alatorre.

Al personal de la Biblioteca del campus Juriquilla, en especial al Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela.

Agradezco profundamente al Dr. Roberto A. Prado Alcalá no solo por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio sino también por todas sus enseñanzas, consejos, paciencia y apoyo en lo académico y lo personal.

A la Dra. Gina Quirarte, por su apoyo en la realización de este trabajo y en mi desarrollo profesional.

Al comité tutor, conformado por la Dra. Teresa Morales y la Dra. Carolina Escobar Briones por sus sugerencias y críticas constructivas, que ayudaron a mejorar este proyecto.

A mis colaboradores, Dra. Andrea Cristina Medina Fragoso, Dra. Paola Cristina Bello Medina, Biólogo Jonathan Sánchez y Bióloga Zoha Bautista por su apoyo en la realización de este trabajo, que fue vital para el desarrollo de este proyecto de investigación.

A la M.V.Z Norma Serafín López no solo por su excelente apoyo técnico para el desarrollo de este trabajo, sino por su amistad.

A la Señora Bertha Islas Rivas y al Sr. Bernardino Osorio por su apoyo técnico y su buen manejo y trato a los animales en el bioterio del Laboratorio de Aprendizaje y Memoria B-04.

A los integrantes del Laboratorio de Aprendizaje y Memoria (B-04), en especial a Alhelí, Antonio, Renata, Carlos, Jonathan, Martha, Rafa y Ángel Méndez (†), por todos esos momentos llenos de crecimiento intelectual y por su entrañable amistad.

DEDICATORIA

A mi amada familia

ÍNDICE

RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUCCIÓN	9
2. ANTECEDENTES	10
2. 1. SISTEMAS DE MEMORIA.....	10
2. 2. ESTRUCTURAS CEREBRALES	13
2. 2. 1. Amígdala	13
2. 2. 2. Hipocampo	22
2. 3. MARCADORES DE ACTIVACIÓN CELULAR.....	32
2. 3. 1. Proteína c-Fos como marcador de activación celular.....	34
2. 4. EFECTO DEL ENTRENAMIENTO AVERSIVO INTENSO	36
3. JUSTIFICACIÓN	40
4. OBJETIVO GENERAL	41
5. HIPÓTESIS	41
6. MATERIALES Y MÉTODOS	41
6. 1. Animales	41
6. 2. Procedimiento conductual.....	43
6. 2. 1. Aparatos	43
6. 2. 2. Entrenamiento	44
6. 2. 3 Extinción	45
6. 3. Histología.....	45
6. 3. 1. Inmunofluorescencia.....	45
6. 3. 2. Análisis de imágenes	47
6. 4. Análisis estadísticos.....	48
7. RESULTADOS	49
7. 1. Conductuales.....	49
7. 2. Análisis histológico	51
7. 2. 1. Amígdala	51
7. 2. 2. Hipocampo	56
7. DISCUSIÓN	59
8. CONCLUSIONES	69
9. REFERENCIAS.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS	93
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	94
APÉNDICE	95

RESUMEN

Los tratamientos que producen amnesia son inefectivos cuando se administran a sujetos que han sido entrenados en tareas aversivas, en las que se aplican choques eléctricos de intensidad relativamente alta. Este efecto se ha encontrado cuando estos tratamientos se aplican en diferentes regiones cerebrales, incluyendo la amígdala y el hipocampo. Se desconocen los mecanismos moleculares inducidos por el entrenamiento incrementado. Para iniciar el estudio de estos mecanismos hicimos un mapeo detallado de las neuronas que expresan c-Fos en cuatro regiones de la amígdala y tres del hipocampo, después de un entrenamiento moderado o intenso de evitación inhibitoria en ratas. Los cerebros de los sujetos experimentales fueron preparados histológicamente, 90 min después del entrenamiento y sus cerebros fueron preparados para la detección inmunohistoquímica de la proteína c-Fos en las siguientes regiones: núcleos centrales, lateral y en las porciones anterior y posterior del núcleo basolateral de la amígdala y en el hipocampo, se exploraron las regiones CA1, CA3 y giro dentado. El entrenamiento moderado indujo un alto porcentaje de neuronas que expresaron c-Fos en la porción anterior del núcleo basolateral, y este porcentaje se incrementó después del entrenamiento intenso. No hubo cambios en las otras regiones amigdalinas. En el hipocampo hubo un incremento significativo en el porcentaje de núcleos positivos a c-Fos en el giro dentado después del entrenamiento intenso, pero no hubo cambios en CA1 y CA3, independientemente de la intensidad del entrenamiento. Estos resultados muestran que el entrenamiento de evitación inhibitoria produce una expresión de c-Fos, localizada en diferentes regiones de la amígdala e hipocampo, dependiente de la intensidad del entrenamiento, por lo que estos resultados muestran que hay cambios plásticos sinápticos necesarios para la formación de la memoria del aprendizaje aversivo moderado e intenso.

ABSTRACT

Typical amnestic treatments are ineffective when administered to subjects trained in aversively motivated tasks using relatively high foot-shock intensities. This effect has been found when treatments that disrupt neuronal activity are administered to different regions of the brain, including the amygdala and hippocampus. However, the molecular mechanisms induced by this intense training are unknown. We made a detailed mapping of c-Fos-expressing neurons in four regions of the amygdala and three of the hippocampus after moderate and intense one-trial inhibitory avoidance training. Rats were sacrificed 90 min after training or after appropriate control procedures, and their brains were prepared for immunohistochemical c-Fos protein detection in the central, lateral, and anterior and posterior parts of the basolateral amygdaloid nucleus and in the hippocampus, the CA1, CA3 and dentate gyrus regions were explored. We found a high percentage of neurons expressing c-Fos in the anterior part of the basolateral nucleus after moderate training, and this percentage increased further after intense training. Moderate and intense training did not induce changes in c-Fos expression in other explored amygdaloid regions. The main finding in the hippocampus was a significant increase in the percentage of c-Fos-positive nuclei in the dentate gyrus after intense training, but there were no changes in the expression of c-Fos in CA1 and CA3 hippocampal regions, regardless of the intensity of training. These results show that inhibitory avoidance training produces a localized expression of c-Fos in the basolateral anterior nucleus of the amygdala and dentate gyrus, which are dependent upon the intensity of inhibitory avoidance training and indicate that synaptic plastic changes in these regions may be required for the formation of memory of moderate and intense aversive learning.

1. INTRODUCCIÓN

La capacidad de almacenar los recuerdos por periodos que ocurren desde días a semanas, meses, años o toda una vida es una de las funciones críticas para las conductas adaptativas en los animales (James, 1890). A través del aprendizaje, una experiencia puede modificar la conducta de manera más o menos permanente y es a partir de este aprendizaje que se puede formar una memoria que es retenida para emplearla en diversas situaciones y periodos de la vida (Kandel, 2001).

Los recuerdos a largo plazo no se forman inmediatamente después de haber aprendido, sino que se desarrollan con el tiempo. Uno de los primeros pasos que involucra la formación de la memoria es una fase rápida de expresión de genes *de novo*, siendo la transcripción la primera etapa reguladora en la expresión génica, la cual a su vez está mediada por factores de transcripción tales como: proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB, por sus siglas en inglés, cAMP responsive element binding protein), zif268/EGR1, c-Jun y c-Fos (Martinez *et al.*, 2013; Ressler *et al.*, 2002). En particular el gen *c-fos* que codifica la proteína c-Fos, forma un complejo heterodimérico con la proteína c-Jun para constituir el factor de transcripción activador de la proteína-1 (AP-1). Esta proteína regula la expresión de genes mediante la unión a secuencias de reconocimiento de AP-1, encontrada en una variedad de genes diana (Chiu *et al.*, 1989; Greenberg y Ziff, 1984; Halazonetis *et al.*, 1988; Kouzarides y Ziff, 1988; Muller *et al.*, 1996), los cuales potencialmente median la respuesta a largo plazo de señales que regulan el crecimiento y el desarrollo (Franza *et al.*, 1988). Aunque la expresión de c-Fos ha sido asociada a procesos de división celular, otras señales, como la excitación neuronal, la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Greenberg *et al.*, 1986; Morgan y Curran, 1986) y la estimulación por neurotransmisores (Greenberg *et al.*, 1986) también pueden inducir la expresión de esta proteína, por lo cual ha sido empleada de manera extensa como un marcador indirecto de actividad neuronal. Amplia evidencia experimental ha mostrado que la interferencia con la actividad normal de ciertas estructuras cerebrales produce deficiencia de la memoria, y se ha asumido que una serie de núcleos cerebrales son esenciales para su

establecimiento. Sin embargo, pruebas experimentales han demostrado que la administración de un estímulo aversivo intenso (como la administración de un choque eléctrico) protege a la memoria en contra de los efectos de agentes amnésicos administrados en diversas estructuras cerebrales (Prado-Alcalá *et al.*, 2012), incluyendo la amígdala (Parent *et al.*, 1995; Parent y McGaugh, 1994; Salado-Castillo *et al.*, 2011; Thatcher y Kimble, 1966) y el hipocampo (Garín-Aguilar *et al.*, 2014; Medina *et al.*, 2019; Quiroz *et al.*, 2003; Salado-Castillo *et al.*, 2011). Sin embargo, los mecanismos de este efecto protector de la memoria inducido por el entrenamiento aversivo intenso son poco conocidos.

En el presente estudio se realizó un mapeo de c-Fos en dos regiones cerebrales, la amígdala y el hipocampo después de un entrenamiento aversivo moderado e intenso en una tarea evitación inhibitoria (EI), en la que la expresión de c-Fos ha sido poco estudiada (Zhang *et al.*, 2011). Propusimos que el entrenamiento moderado induciría la expresión de c-Fos en las células de la amígdala (McGaugh *et al.*, 2002; McGaugh y Roozendaal, 2002; Roozendaal *et al.*, 2001, 2002; Roozendaal y McGaugh, 1996, 1997b, 1997a, 2011; Vazdarjanova *et al.*, 2001) y el hipocampo (Garín-Aguilar *et al.*, 2014; Medina *et al.*, 2019; Quiroz *et al.*, 2003; Salado-Castillo *et al.*, 2011) debido a que son regiones involucradas en la consolidación de la memoria de EI. Una segunda predicción fue que el entrenamiento intenso aumentaría aún más la cantidad de neuronas que expresan c-Fos en estas regiones, debido a que este tipo de entrenamiento recluta una mayor población de células activas en el cuerpo estriado (González- Franco *et al.*, 2017), en un periodo temprano posterior al entrenamiento, en la tarea de EI.

2. ANTECEDENTES

2. 1. SISTEMAS DE MEMORIA

El aprendizaje y la memoria son funciones cruciales en la interacción de un individuo con el medio ambiente e involucra la participación de grandes redes distribuidas en el cerebro. El aprendizaje se describe como un cambio persistente en la conducta, dependiente de la experiencia; y la memoria como la representación

interna de esta experiencia, que de manera tradicional se ha definido como el engrama (Marshall y Bredy, 2016).

Mediante la memoria el sistema nervioso codifica, almacena y recupera una gran variedad de tipos de información que resultan de vital importancia para el individuo. La codificación es el registro inicial de la adquisición de información, el almacenamiento es el mantenimiento de la información a lo largo del tiempo en el sistema nervioso (representado como una huella de memoria) y la recuperación es el proceso mediante el cual la información almacenada es evocada y afecta el comportamiento en curso (Kandel *et al.*, 2014).

Se ha hipotetizado que la formación de la memoria ocurre en regiones específicas del cerebro y ha ganado apoyo en las últimas décadas debido principalmente a informes de disociaciones entre regiones del cerebro especializadas para la adquisición y almacenamiento de la información de varios tipos de tarea. Mientras que las disociaciones sugieren independencia entre los sistemas múltiples de memoria, un número creciente de reportes indican que los sistemas de memoria pueden interactuar cooperativa o competitivamente (Squire, 2004; Ferbinteanu, 2019). Investigaciones sobre la memoria en roedores han identificado múltiples sistemas de procesamiento de la memoria al mostrar múltiples disociaciones del área del cerebro con relación a las tareas; por ejemplo, se ha observado que el daño en un área del cerebro impide el aprendizaje y la memoria de una tarea pero no de otra, mientras que el daño en una segunda área del cerebro impide el aprendizaje para la segunda pero no para la primera tarea (Bussey *et al.*, 1997; Kesner *et al.*, 1993; McDonald y White, 2013). En cuanto a la idea de que los sistemas de memoria pueden interactuar de manera cooperativa o competitiva, algunos hallazgos sugieren que el procesamiento entre diferentes sistemas de memoria puede competir por el control sobre el aprendizaje (Gold, 2004; Packard y Knowlton, 2002; White y McDonald, 2002). En la medida que se elimine o reduzca la competencia, como, removiendo un sistema no asociado con la tarea o farmacológicamente disminuyendo la contribución de un sistema, mejora el aprendizaje. Por ejemplo, en un estudio examinaron los efectos de la inyección de

lidocaína en el hipocampo mientras que las ratas fueron entrenadas el laberinto de 4 brazos en su versión espacial (dependiente del hipocampo) o de respuesta (dependiente del estriado). Las ratas fueron entrenadas para encontrar la comida al final de uno de los brazos, en la primera versión (versión de lugar o espacial) el brazo de inicio, donde comenzaba el individuo, cambiaba y la recompensa estaba siempre en el mismo lugar del laberinto. En el segundo caso, los brazos de inicio de la tarea también variaron y la recompensa fue siempre localizada a la derecha (o a la izquierda) del inicio (versión de respuesta). Cuando se administró lidocaína en el hipocampo, las ratas presentaron un fuerte impedimento para adquirir la tarea en su versión de lugar. Sin embargo, la inyección de lidocaína en el hipocampo facilitó el aprendizaje de la tarea en la versión de respuesta (Chang y Gold, 2003). Estos hallazgos son análogos a los obtenidos en tareas similares usando bupivacaina para inducir inactivaciones reversibles del hipocampo (Schroeder *et al.*, 2002), por lo que se sugiere que el hipocampo intacto se activa durante el entrenamiento para intentar, sin éxito, resolver el laberinto usando estrategias de lugar, por lo que cuando esta inactivado, la estrategia ineficiente del aprendizaje es removida, permitiendo que el éxito sea, probablemente estriatal, y la solución de respuesta emerge de manera rápida durante el entrenamiento.

La teoría de los sistemas múltiples de memoria sugiere que el cerebro de los mamíferos tiene al menos tres sistemas de memoria principales que operan en paralelo (White y McDonald, 2002). Cada sistema está compuesto por una estructura central: amígdala, estriado dorsal e hipocampo, y se denominan por los nombres de los sistemas anatómicos de éstas: el sistema de la amígdala, el sistema del estriado y el sistema del hipocampo (Figura 1). Cada uno incluye su estructura central y sus conexiones aferentes y eferentes de estas estructuras y se ha propuesto que, aunque los sistemas tienen acceso a gran parte de la misma información, cada uno la trata de manera diferente y pueden influir entre sí directamente de forma cooperativa o competitiva, como se mencionó. Los sistemas procesan (es decir, filtran, combinan, asocian y modifican) la información de una experiencia (tales como estímulos, respuestas internas y externas y reforzadores), y ésta converge en un punto o puntos para influir en la conducta actual o futura.

PROCESAMIENTO EN PARALELO

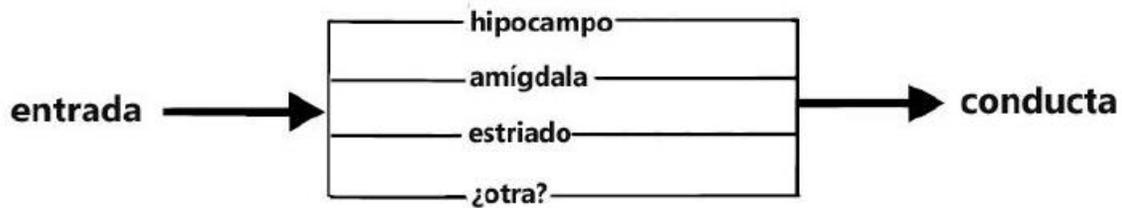


Figura 1. El concepto del procesamiento en paralelo. El hipocampo, el estriado dorsal y la amígdala son estructuras centrales en tres sistemas neurales, cada uno de los cuales puede funcionar de manera independiente. Cada sistema recibe información similar acerca de situaciones en la que se puede dar el aprendizaje y cada uno procesará esa información de acuerdo con un conjunto diferente de principios que enfatizan distintas relaciones entre los elementos de la situación (modo de procesamiento). Todos los sistemas influyen en la conducta del individuo, ya sea cooperativa o competitivamente. El procesamiento dentro de cada sistema puede llevar al almacenamiento de la información (memoria) que influye en el procesamiento de información similar en el futuro. Modificado de White y McDonald (2002).

Entre estas tres estructuras centrales, el hipocampo es crítico para la formación de memorias episódicas en las que se establece una representación compleja que está integrada por varios elementos de una situación o evento. La amígdala se ha involucrado en la formación y almacenamiento de recuerdos emocionales. Estas memorias emocionales únicamente codifican la valencia subjetiva de la experiencia (positiva o negativa). El estriado dorsal ha sido implicado en el aprendizaje y memoria de procedimientos y hábitos (McDonald *et al.*, 2004).

2. 2. ESTRUCTURAS CEREBRALES

2. 2. 1. Amígdala

La amígdala es una región del cerebro importante para el procesamiento emocional, el circuito y su función se han conservado bien a lo largo de la evolución, aunque existen diferencias entre especies. Incluso especies de vertebrados no mamíferas (como reptiles, pájaros y peces) tienen una región cerebral similar a la amígdala en circuito y función (Figura 2) (Janak y Tye, 2015; Jarvis *et al.*, 2005; Martínez-García *et al.*, 2002).

Los estudios de lesiones en primates no humanos presentaron las primeras pistas de que la amígdala era importante para las reacciones emocionales a los estímulos (Brown y Schäfer, 1888), ya que la ablación de esta reduce agresión y conductas defensivas (Klüver y Bucy, 1937). Después de estos primeros estudios, las lesiones de la amígdala tanto en roedores (Blanchard y Blanchard, 1972; LeDoux *et al.*, 1990) como en humanos (Adolphs *et al.*, 1994; Anderson y Phelps, 2001) revelaron una fuerte conservación de la función de la amígdala en estas especies. Además de un deterioro en el reconocimiento de estímulos aversivos y en un tipo de aprendizaje emocional llamado condicionamiento de miedo. Este es un aprendizaje en el cual, en un inicio un estímulo neutral que se vuelve posteriormente condicionado es pareado con un estímulo incondicionado, como un choque eléctrico, lo que conlleva al sujeto a mostrar un comportamiento de miedo ante el estímulo condicionado. Es importante mencionar que en la tarea empleada en el presente trabajo, la presentación del estímulo aversivo resulta en un estado emocional aprendido que involucra el condicionamiento de miedo al contexto (condicionamiento clásico Pavloviano), seguido por la adquisición de las respuestas instrumentales de escape o evitación (aprendizaje operante de acción-resultado o de procedimiento) (Ögren y Stiedl, 2013) y se ha propuesto que la amígdala es una estructura involucrada en la formación de la memoria de este tipo de tarea (Liang *et al.*, 2008; Parent *et al.*, 1995; Parent y McGaugh, 1994; Salado-Castillo *et al.*, 2011; Thatcher y Kimble, 1966).

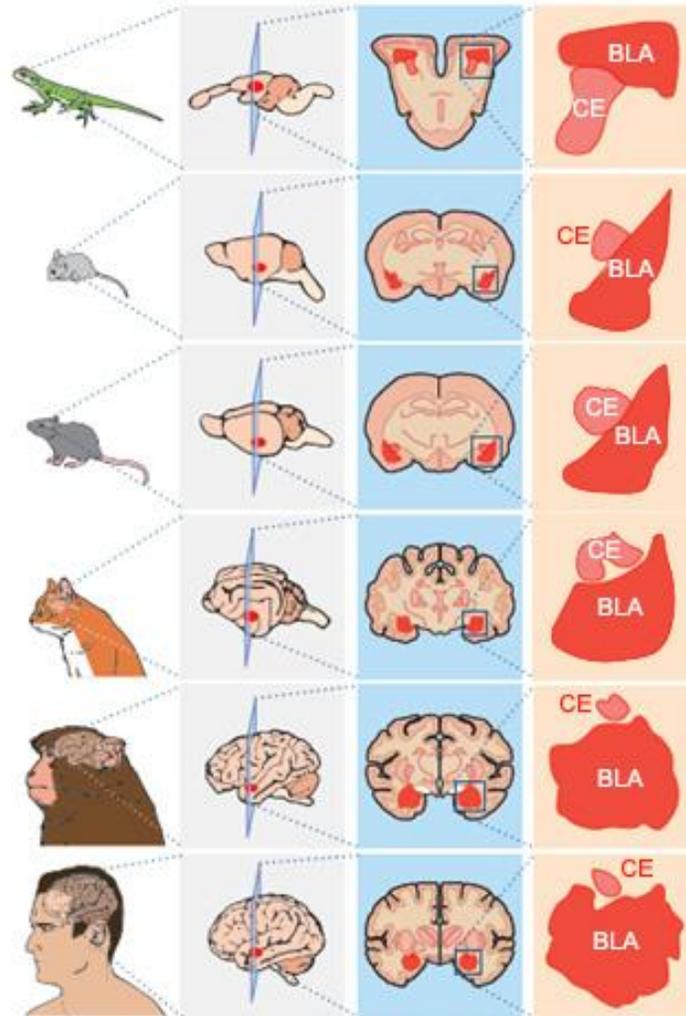


Figura 2. Evolución de la amígdala entre especies. Los núcleos amigdalares primarios y las conexiones y funciones de los circuitos básicos se conservan en todas las especies. Se muestra una imagen ampliada del complejo basolateral de la amígdala (BLA) y el núcleo central de la amígdala (CE) o análogos junto a una sección coronal del cerebro de un lagarto, un ratón, una rata, un gato, un mono y un ser humano. Modificado de Janak y Tye (2015).

2. 2. 1. 1. Anatomía

La amígdala es un complejo nuclear que se encuentra en el lóbulo temporal de los primates y en el cerebro anterior caudoventral de los roedores y otros mamíferos que no tienen un lóbulo temporal bien desarrollado. Está constituida por más de una docena de núcleos, cada uno de los cuales presenta subdivisiones (Figura 3) Los núcleos cortical y medial de la amígdala se distinguen por sus

interconexiones con el sistema olfativo y el hipotálamo. El núcleo central (CE) es el único núcleo con proyecciones amplias hacia el tronco encefálico. El complejo basolateral (BLA, por sus siglas en inglés, basolateral amygdala), se caracteriza por amplias interconexiones con áreas corticales de orden superior en las cortezas prefrontal, temporal, insular e hipocampal (McDonald, 2020; Sah *et al.*, 2003).

Las porciones corticales y medial de la amígdala están ubicadas a lo largo de las superficies ventral y medial de la amígdala en la mayoría de los mamíferos, incluidos los roedores. El núcleo amigdalador CE (CEm/ CEI; con subdivisiones medial y lateral) está ubicado dorsolateral al núcleo medial. El BLA se encuentra en lo profundo de los núcleos corticales y centrales. Los núcleos basolaterales, comprenden el lateral (LA), el basal (BL; denominado como núcleo basolateral) y el basal accesorio (BA; que también se conoce como núcleo basomedial o BM). A menudo, estos tres núcleos son denominados complejo basolateral (Sah *et al.*, 2003). Cada núcleo tiene varias subdivisiones LA: subdivisiones dorsolateral (LAdl), ventrolateral (LAvl) y ventromedial (LAvm); BL: subdivisiones anterior (BLa), posterior (BLp) y ventral (BLv); BM: subdivisiones anterior (BMa) y posterior (BMp) de Paxinos y Watson, 2007 (Figura.3).

En las porciones corticales y BLA de la amígdala, las neuronas de proyección están constituidas, alrededor de un 85%, por neuronas piramidales glutamatérgicas y las neuronas restantes son principalmente interneuronas GABAérgicas, no piramidales (McDonald, 2020). Las neuronas CEI y CEm son principalmente neuronas espinosas GABAérgicas de proyección, similares a las del estriado. Por otro lado, un núcleo de neuronas GABAérgicas interconectadas, denominadas como células intercaladas (IN), se encuentra entre el BLA y el CE, proporcionando una importante fuente de inhibición (Ehrlich *et al.*, 2009; Marowsky *et al.*, 2005).

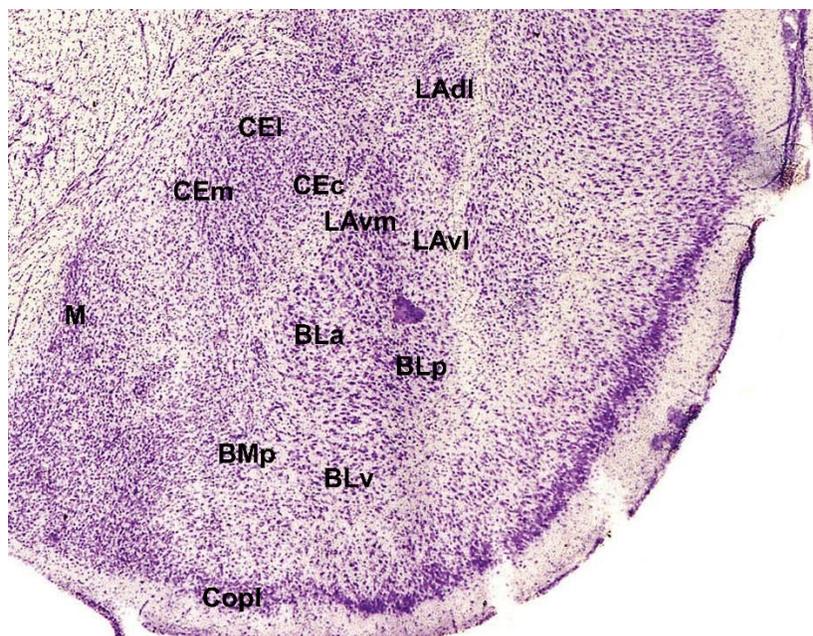


Figura 3. Corte coronal de la amígdala teñido con Nissl. BLa, núcleo basolateral anterior; BLp, núcleo basolateral posterior; BLv, núcleo basolateral ventral; BMp, núcleo basomedial posterior; CEI, núcleo central lateral; CEm, núcleo central medial; Copl, núcleo cortical posterolateral; LAAdl, núcleo dorsolateral; LAvl, ventrolateral; LAvm, núcleo ventromedial, M, núcleo medial (Paxinos y Watson, 2007).

2. 2. 1. 2. Aferencias y Eferencias

El núcleo lateral (LA) recibe abundantes entradas sensoriales talámicas y corticales, y se considera la región principal de entrada de la amígdala. La porción dorsal de LA proyecta hacia la porción ventral. LA envía una proyección prominente al núcleo BM y también envía proyecciones al núcleo basolateral (BL), la corteza periamigdalóide, la porción dorsal de la división central del núcleo medial, el núcleo cortical posterior, el núcleo central y la división lateral del área amígdalohipocámpal, pero en una magnitud relativamente menor (Pitkänen *et al.*, 1995).

La mayoría de las fibras aferentes en BL provienen de LA (Janak y Tye, 2015; Spanpanato *et al.*, 2011). Es importante tener en cuenta que BL envía proyecciones a una serie de áreas corticales que proyectan a LA (Stefanacci y Amaral, 2002), formando un bucle de información sensorial entre la amígdala y la corteza cerebral (Cho *et al.*, 2013). Terminales BL proyectan al núcleo central de la amígdala, que proporciona salidas a las regiones subcorticales involucradas en varios

componentes del comportamiento del miedo. Sin embargo, CE no tiene proyecciones de regreso al BL (Orsini y Maren, 2012; Poulin *et al.*, 2013) (Figura 4).

Las neuronas en el BL también se proyectan hacia las células intercaladas de la amígdala (IN), que a su vez se proyectan hacia el núcleo CE (Royer *et al.*, 1999). Dado que las IN están compuestas por neuronas GABAérgicas, esta vía podría mediar en la inhibición anticipada de CE por parte del BL, un proceso que podría tener un papel importante en el control del miedo. Por lo tanto, el BL es capaz tanto de activar (vía directa) como de inhibir (a través de los IN) las reacciones de miedo mediadas por las salidas de CE. El equilibrio entre la actividad de las vías directa e indirecta es la base del control del miedo. Por lo tanto, durante el estrés u otros estados emocionales hiperdopaminérgicos, la activación de las entradas dopaminérgicas a las IN provoca una hiperpolarización mediada por receptores D1 de sus células GABAérgicas que da como resultado respuestas de miedo mejoradas asociadas con estados emocionales elevados (Marowsky *et al.*, 2005). Por el contrario, la extinción del miedo aprendido depende de la reducción de la excitabilidad de las neuronas de proyección CE por parte de la corteza prefrontal medial (Quirk *et al.*, 2003). Es decir, durante la extinción del miedo, se cree que el aumento de la actividad en la corteza prefrontal medial, particularmente de la porción infralímbica, excita las IN, lo que a su vez reduciría la respuesta del miedo al disminuir la salida de la amígdala a través de la inhibición de las neuronas de salida CEm (Amano *et al.*, 2010; Amir *et al.*, 2011; Sierra-Mercado *et al.*, 2011).

BM une la conexión entre LA y el CEm, que es la región de salida que contribuye con la mayoría de las proyecciones de la amígdala a los efectores del miedo del tronco encefálico. Además, BM proyecta a varias regiones cerebrales ansiolíticas, como el núcleo anterodorsal del núcleo del lecho de la estría terminal (BNST, por sus siglas en inglés) y la corteza prefrontal medial ventral (Adhikari *et al.*, 2015; Petrovich *et al.*, 1996). Pero no se proyecta directamente a las regiones ansiogénicas, como el núcleo oval BNST y la corteza prefrontal medial dorsal (Kim *et al.*, 2013; Petrovich *et al.*, 1996).

La amígdala recibe información sobre el entorno externo a través del tálamo sensorial y las cortezas sensoriales, que se proyectan hacia la LA, esta proyecta dentro de la BLA a la BL y BM, así como al núcleo CE. El núcleo BLA está conectado de manera recíproca con regiones corticales, la corteza prefrontal y el hipocampo (McDonald, 1998), así como con áreas de asociación sensorial; en los primates estas conexiones se extienden a las áreas sensoriales primarias (Freese y Amaral, 2005). Por lo tanto, el BLA transmite información amplia a través de las regiones corticales, pero su procesamiento neuronal es afectado por las proyecciones excitatorias de estas regiones.

Aunque diferentes regiones de la amígdala se proyectan hacia el hipocampo y las áreas parahipocampales (Pikkarainen *et al.*, 1999), la fuente principal de tales proyecciones es el BL, que también proporciona proyecciones hacia la corteza prefrontal. El BL tiene como blanco principal el estrato *oriens* y el estrato *radiatum* de CA3 y CA1 y el subículo, principalmente en el hipocampo ventral. El BM también se proyecta al estrato *lacunosum* moleculare de CA1, LA se proyecta a la capa III de la corteza entorrinal, el subículo y el parasubículo. En general, se supone que los núcleos amigdalinos que se proyectan a la formación del hipocampo dan lugar a campos terminales segregados en lugar de superpuestos (Pikkarainen *et al.*, 1999). Desde un punto de vista funcional, la estimulación de la amígdala altera la representación espacial de las células del lugar del hipocampo y modifica sus tasas de disparo, de manera similar al estrés conductual (Kim *et al.*, 2012). Además, se ha observado que BLA puede regular los efectos de los glucocorticoides en la recuperación (Roosendaal *et al.*, 2003) y consolidación (Roosendaal *et al.*, 1999; Roosendaal y McGaugh, 1997a) de la memoria que involucra al hipocampo.

Los núcleos amigdalinos que proyectan de manera densa al núcleo acumbens (NAc) core y shell son BL y BM, aunque las porciones corticales de la amígdala también proyectan al NAc shell (Ubeda-Bañon *et al.*, 2007, 2008). Se sabe que tanto el BLA como el NAc reciben una inervación dopaminérgica significativa, y los estímulos estresantes aumentan la liberación de dopamina en ambas estructuras (Inglis y Moghaddam, 1999; Inoue *et al.*, 1994). Adicionalmente, las

infusiones de antagonistas de los receptores de dopamina post-entrenamiento deterioran la memoria cuando se administran en el BLA o en el NAc (LaLumiere *et al.*, 2005; Setlow y McGaugh, 1998). También hay evidencia de que el BLA influye en la liberación de dopamina en el NAc. La estimulación eléctrica del BLA aumenta la liberación de dopamina de las terminales nerviosas dopaminérgicas en el NAc, independientemente de la actividad en el área ventral tegmental (el origen de la entrada de dopamina en el NAc) y la corteza prefrontal medial (Floresco *et al.*, 1998; Howland *et al.*, 2002). También se ha propuesto que la vía BLA-NAc juega un papel esencial en la mediación de los efectos de los glucocorticoides en la consolidación de la memoria (Roosendaal *et al.*, 2001). Proyecciones amigdalinas también inervan el cuerpo estriado dorsal. Estas proyecciones se originan principalmente del BL, con una menor contribución del BM y LA, e inervan partes del caudado-putamen (McDonald, 1991). Y se ha propuesto que estas importantes proyecciones pueden desempeñar un papel en el aprendizaje instrumental (Balleine *et al.*, 2003; Corbit *et al.*, 2013). Las salidas son predominantemente unidireccionales del BLA incluyen también al núcleo BNST y al núcleo CE. Cabe destacar que hay excepciones a este modelo serial de flujo de información; el BL y el CE también reciben información sensorial (Holland y Gallagher, 2003).

Las proyecciones corticales y estriadas de la amígdala se originan en el BLA. Por el contrario, BLA tiene pocas o ninguna salida hacia el tronco encefálico, mientras que CE envía fuertes proyecciones a varias estructuras del tronco encefálico (Hopkins y Holstege, 1978) que están involucradas en la generación del correlatos conductuales y autonómicos del miedo (Poulin *et al.*, 2013). Sin embargo, BLA y CE envían proyecciones superpuestas al hipotálamo lateral, regiones basales del prosencéfalo que contienen neuronas colinérgicas corticopetales, así como al núcleo BNST. El BNST y el CE están conectados recíprocamente y sus proyecciones al tronco encefálico se superponen de manera amplia. En cuanto a las células IN, estas no proyectan fuera de la amígdala, a excepción de una proyección del grupo IN principal a la sustancia innominada y banda diagonal de Broca (rama horizontal) (Pape y Pare, 2010).

Si bien la mayoría de las estructuras prosencefálicas, incluida la amígdala, reciben información de los sistemas neuromoduladores, relativamente pocas contribuyen con proyecciones densas a estos grupos de células. La amígdala es una notable excepción a esta regla general. A través de estas proyecciones, la amígdala puede influir en la excitabilidad general de gran parte del cerebro, incluso de las estructuras a las que no está conectado directamente (Pape y Pare, 2010). A su vez, debido a que las entradas neuromoduladoras a menudo ejercen influencias facilitadoras sobre la plasticidad sináptica (Abraham, 2008), es probable que estas vías mejoren los aprendizajes de condicionamiento de miedo y pueden explicar en parte cómo la amígdala facilita la formación de recuerdos para experiencias emocionales. Con la excepción de proyecciones sustanciales de BLA a la sustancia innominada y la banda diagonal de Broca (Jolkkonen *et al.*, 2002; Krettek y Price, 1978), la mayoría de las proyecciones de la amígdala a grupos de células neuromoduladoras se originan en CE. Estas incluyen proyecciones a grupos de células colinérgicas y noradrenérgicas ubicadas en la unión de la protuberancia y el mesencéfalo, así como grupos de células dopaminérgicas del área ventral tegmental y de la sustancia negra parte compacta (Hopkins y Holstege, 1978; Price y Amaral, 1981).

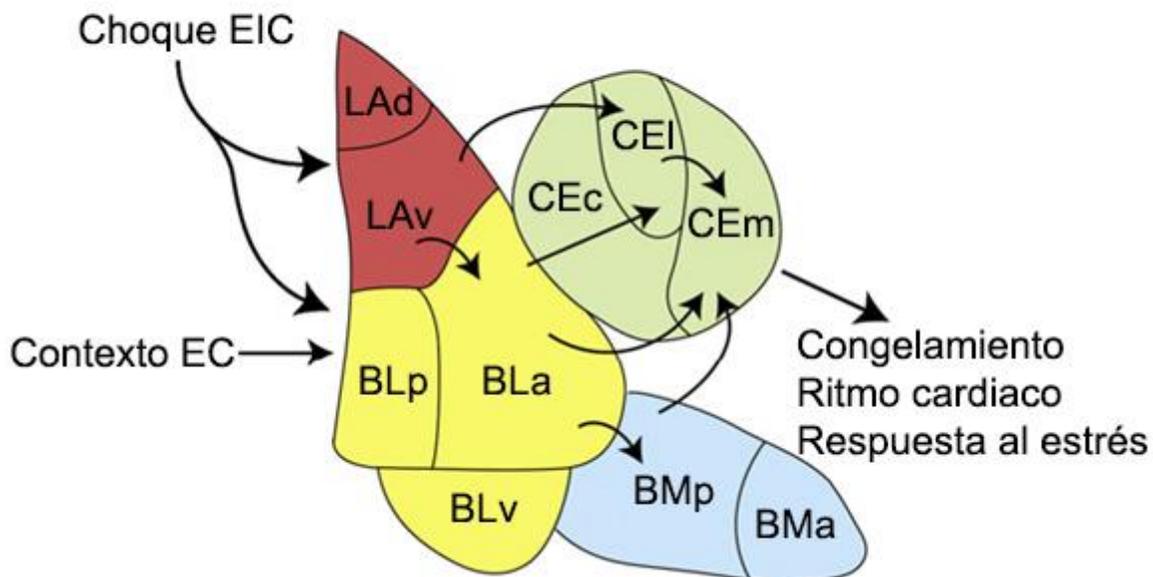


Figura 4. Anatomía y conectividad de la amígdala durante el condicionamiento del miedo en ratas. La amígdala consta de varios núcleos que son parte integral de la adquisición y retención de los recuerdos del miedo. La información del estímulo condicionado (EC) y del estímulo incondicionado (EIC) converge dentro de la amígdala lateral [LA; amígdala lateral dorsal (LAd) y amígdala lateral ventral (LAv)], así como la amígdala basolateral [BL; amígdala basolateral posterior (BLp), amígdala basolateral anterior (BLa) y amígdala basolateral ventral (BLv)]. Por último, la información del estímulo condicionado contextual se transmite a la amígdala basal. Desde el BL, la información se transmite al CEm, que se cree que es la salida de la amígdala, ya sea a través del CEL o a través de la amígdala basomedial [BM; amígdala basomedial posterior (BMp) y amígdala basomedial anterior (BMa)]. Las proyecciones de CEm a otras estructuras como la sustancia gris periacueductal, que producen varias respuestas de miedo, incluyendo congelación y aumentos en la frecuencia cardíaca (Modificado de Orsini y Maren, 2012).

2. 2. 2. Hipocampo

Los primeros conocimientos sobre el hipocampo en relación con la memoria declarativa comenzaron con la descripción del paciente Henry Gustav Molaison (H.M) por William Beecher Scoville y Milner (1957). Desde el estudio del caso H.M., quien perdió la capacidad de formar nuevos recuerdos declarativos después de la extirpación quirúrgica del hipocampo y estructuras cercanas del lóbulo temporal para tratar una epilepsia intratable, el hipocampo ha estado a la vanguardia de la investigación sobre las bases de la neurobiología de la memoria (Knierim, 2015).

El hipocampo es esencial para la representación espacial de los entornos y para la capacidad de recordar eventos específicos (memoria episódica) e información de hechos (memoria semántica) (Felix-Ortiz y Tye, 2014; Geva-Sagiv *et al.*, 2015; Goosens, 2011; Lisman *et al.*, 2017). El hipocampo apoya estas habilidades proporcionando un marco espacial y temporal para relacionar experiencias, creando un "mapa cognitivo" del mundo experimentado por el organismo (Lisman *et al.*, 2017).

La capacidad de discriminar entre experiencias similares es una característica fundamental de la memoria episódica y el hipocampo es crítico para la discriminación de recuerdos que son similares en contenido (Brock *et al.*, 2012). Se ha hipotetizado que esta función cognitiva está respaldada por dos procesos neuronales llamados separación de patrones, que generalmente se cree que se implementa en el giro dentado (DG) (Treves *et al.*, 2008) y /o CA3 (Leutgeb *et al.*, 2007; Yassa y Stark, 2011) y el completamiento de patrones que se lleva a cabo en la región de CA3 (Yassa y Stark, 2011). La separación de patrones se define como la transformación de un conjunto de patrones de entrada (representaciones) similares de actividad neuronal en patrones de salida menos similares. Mientras que el completamiento de patrones es el proceso mediante el cual las representaciones incompletas o degradadas se completan en función de las representaciones previamente almacenadas (Colgin *et al.*, 2008; Wilson, 2009). A pesar de una larga historia de investigación sobre el tema, principalmente *in silico* (a través de simulaciones en computadora) (Chavlis y Poirazi, 2017), aún no está claro cómo la actividad de las neuronas individuales subyace en este cálculo. Sin embargo, el papel computacional de CA1 en el procesamiento de la memoria sigue sin estar claro y no muestra una actividad consistente para la separación, ni para el completamiento de patrones. Numerosos experimentos tanto en roedores como en humanos han demostrado que en el hipocampo se generan representaciones de retrasos temporales o de orden temporal (Davachi y DuBrow, 2015; Eichenbaum, 2014; Mau *et al.*, 2018). Lo anterior, indica que el hipocampo juega un papel fundamental en la organización temporal de los recuerdos, y que un mecanismo potencial para esta organización temporal son las "células del tiempo" del

hipocampo, que se disparan en momentos específicos en experiencias estructuradas temporalmente dichas neuronas han sido identificadas en CA1 y CA3 del hipocampo (Kraus *et al.*, 2013; MacDonald *et al.*, 2011, 2013; Modi *et al.*, 2014; Pastalkova *et al.*, 2008; Salz *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2015), así como en la corteza entorrinal medial (Kraus *et al.*, 2015).

2. 2. 3. 1. Anatomía

Anatómicamente hay grandes diferencias en los patrones de conectividad a lo largo del eje longitudinal del hipocampo. Su forma curva está presente en todos los órdenes de mamíferos y corre a lo largo de un eje dorsal (septal) a ventral (temporal) en roedores, que corresponde a un eje posterior a anterior en humanos (Figura 5 a y b). El mismo circuito intrínseco básico se mantiene a todo el largo del eje y entre especies (Figura 5 c). El hipocampo dorsal es la parte más rostral del hipocampo. A nivel más caudal, el hipocampo se curva ventralmente. El hipocampo dorsal recibe entradas de la corteza entorrinal medial. El hipocampo ventral está altamente conectado con la corteza prefrontal medial, el NAc, la amígdala y el hipotálamo. En roedores la porción ventral del hipocampo, la cual corresponde al hipocampo anterior en primates y humanos, esta principalmente involucrada en el estrés y aspectos motivaciones del aprendizaje, mientras que el hipocampo dorsal, el cual corresponde a la porción del hipocampo posterior en primates y humanos, se ha relacionado principalmente con funciones cognitivas (Fanselow y Dong, 2010; Strange *et al.*, 2014; Yang y Wang, 2017).

El hipocampo está formado por el GD, los campos de CA1-CA3 y subículo (Figura 5, c; Figura 6). En el GD está la capa del hilus, la capa de células granulares, y la capa molecular (estrato molecular). La región CA (Cuerno de Amón), es subdividida en: CA3, en esta región se distinguen 4 subcapas: la capa de células piramidales, compuesta por el soma de las células piramidales, el estrato *lucidum*, representa la entrada de las fibras musgosas del GD, el estrato *radiatum*, que está formado por las dendritas apicales de las neuronas en el estrato piramidal y más superficialmente el estrato *lacunosum-molecular*, que comprende las terminaciones

de las dendritas apicales de las células piramidales. En CA1 y CA2, la laminación es similar a CA3, con la excepción de que falta el estrato *lucidum*. En el subículo, la capa superficial generalmente se denomina capa molecular, a su vez dividida en porciones externa e interna, y las dos capas restantes se denominan capa piramidal (celular, o estrato piramidal) y estrato *oriens*. Este último es muy delgado y muy a menudo no se diferencia específicamente de la sustancia blanca subyacente del cerebro (Witter, 2010).

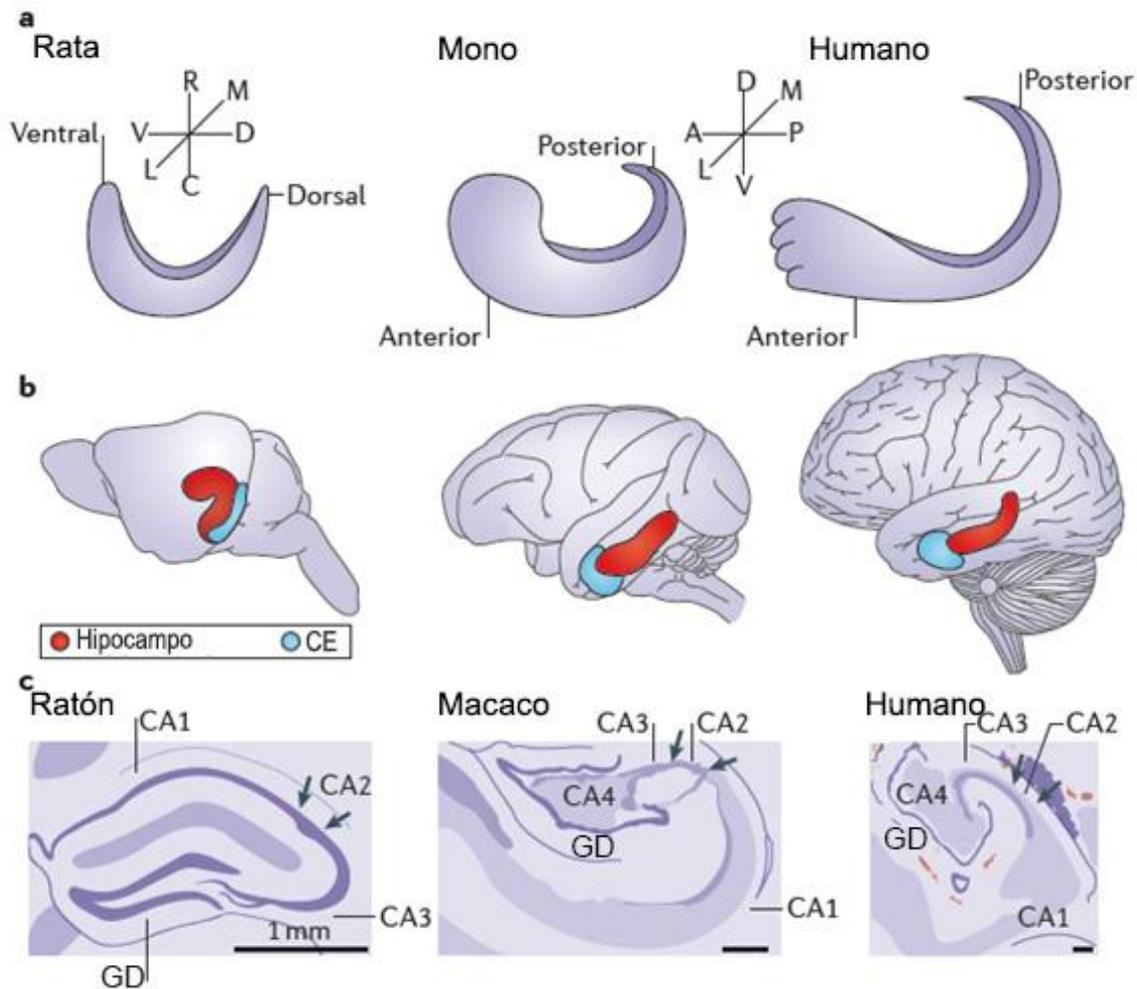


Figura 5. Comparación entre especies de la anatomía del hipocampo. a. Ilustraciones esquemáticas de la orientación del eje largo del hipocampo en ratas, monos macacos y humanos. El eje longitudinal se describe como ventrodorsal en roedores y anteroposterior en primates (también denominado rostrocaudal en primates no humanos). Actualmente no existe una definición anatómica precisa de una porción dorsal (o posterior) del hipocampo en relación con una ventral (o anterior), aunque en general, topológicamente, la primera se ubica cerca de la corteza retrosplenial y la segunda cerca del complejo amigdalino. Tenga en cuenta que se requiere una rotación de 90 grados para que el hipocampo de la rata

tenga la misma orientación que el de los primates. b. El eje longitudinal completo del hipocampo (rojo) se puede ver en cerebros de ratas, monos macacos y humanos, con la corteza entorrinal mostrada en azul. c. Dibujos de secciones transversales con tinción de Nissl de hipocampos de ratón, rhesus y humanos. A anterior; C, caudal; D, dorsal; DG, giro dentado; L, laterales; M, medio; P, posteriores; R, rostral; V, ventral (Modificado de Strange *et al.*, 2014).

En el hipocampo, diversos tipos de neuronas forman microcircuitos y cooperan en el tiempo para el procesamiento y almacenamiento de información. Los tipos de células excitatorias dominantes en los microcircuitos del hipocampo son la célula piramidal, la célula granular y la célula musgosa (Andersen *et al.*, 2007). Estas células forman redes que son las principales estructuras de procesamiento de información en el hipocampo. Las células excitadoras también están rodeadas por una variedad de interneuronas inhibitorias GABAérgicas. Aunque queda por determinar un catálogo completo de tipos de interneuronas inhibitorias, en parte debido a la falta de una nomenclatura universalmente acordada. El criterio principal para la clasificación de las interneuronas es la identidad de los objetivos postsinápticos. Según este criterio, las interneuronas se pueden dividir en dos clases: (1) células inhibitorias perisomáticas y (2) dendríticas. Se pueden distinguir varias otras subclases en función de otros motivos anatómicos, morfológicos, farmacológicos (p. ej., su contenido de neuropéptidos o proteínas de unión al calcio) y fisiológicos (Ascoli *et al.*, 2008). Estas incluyen las células en canasta perisomáticas y las células axo-axónicas en el GD, CA3 y CA1; las células dendríticas biestratificadas y las células del *oriens* y *lacunosum* molecular en CA3 y CA1. También se incluyen las interneuronas de la capa molecular, con axones en la zona de terminación de la vía perforante, así como las interneuronas hiliares con axones en la zona de terminación de la vía perforante, las interneuronas hiliares con axones en la zona de terminación de la vía comisural/asociativa y las células selectivas de interneuronas en el giro dentado (Morgan *et al.*, 2007; Somogyi y Klausberger, 2005). Se ha demostrado que las interneuronas inhibitorias inervan distintas regiones de células piramidales, células granulares y las células musgosas, así como otras interneuronas inhibitorias en la misma área o en áreas del hipocampo a través de modos de retroalimentación y alimentación (Houser, 2007; Morgan *et al.*, 2007; Somogyi y Klausberger, 2005).

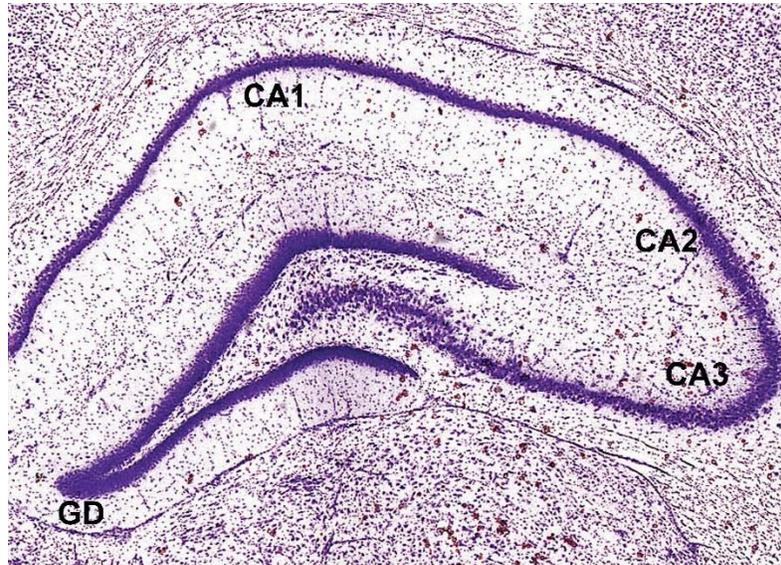


Figura 6. Corte coronal teñido con Nissl del hipocampo de rata. Las partes oscuras representan cuerpos celulares teñidos en los campos del giro dentado (GD) y el cuerno de amón (CA) (Paxinos y Watson, 2007).

2. 2. 3. 2. Aferencias y Eferencias

La corteza entorrinal proporciona la entrada cortical principal al hipocampo, con sus proyecciones más fuertes a través de la vía perforante hacia el giro dentado (DG) (Sinapsis 1). El GD se proyecta a la región CA3 a través de la vía de las fibras musgosas (Sinapsis 2). CA3 se proyecta a la región CA1 a través de las colaterales de Schaffer (Sinapsis 3). Finalmente, CA1 se proyecta de regreso a la corteza entorrinal, completando el bucle. Una adición importante al circuito trisináptico clásico es que los axones de CA3, además de sus proyecciones a CA1, envían colaterales que hacen sinapsis con otras neuronas de CA3 (Figura 7). Originalmente se creía que el circuito del bucle trisináptico era unidireccional y estaba contenido principalmente dentro de una sección transversal (o lámina) del hipocampo. La 'hipótesis lamelar' proponía que el hipocampo estaba estructurado como una pila de estas laminillas, organizadas como módulos funcionales independientes a lo largo del eje longitudinal del hipocampo. Sin embargo, los estudios de trazado anatómico modernos han revelado una conectividad generalizada a lo largo del eje longitudinal, lo que demuestra que los cortes transversales (secciones transversales, como en la Figura 7) a través del hipocampo no son funcionalmente independientes. La

conectividad dentro del eje transversal también es más compleja, con múltiples circuitos de procesamiento paralelos y circuitos de retroalimentación (Basu y Siegelbaum, 2015). La corteza entorrinal se proyecta no solo al DG, sino también directamente a las regiones CA3 y CA1. CA3 proporciona una proyección de retroalimentación al DG, a través de las células musgosas excitatorias del hilio dentado, violando así la noción anterior de que el procesamiento del hipocampo es exclusivamente unidireccional (Knierim, 2015).

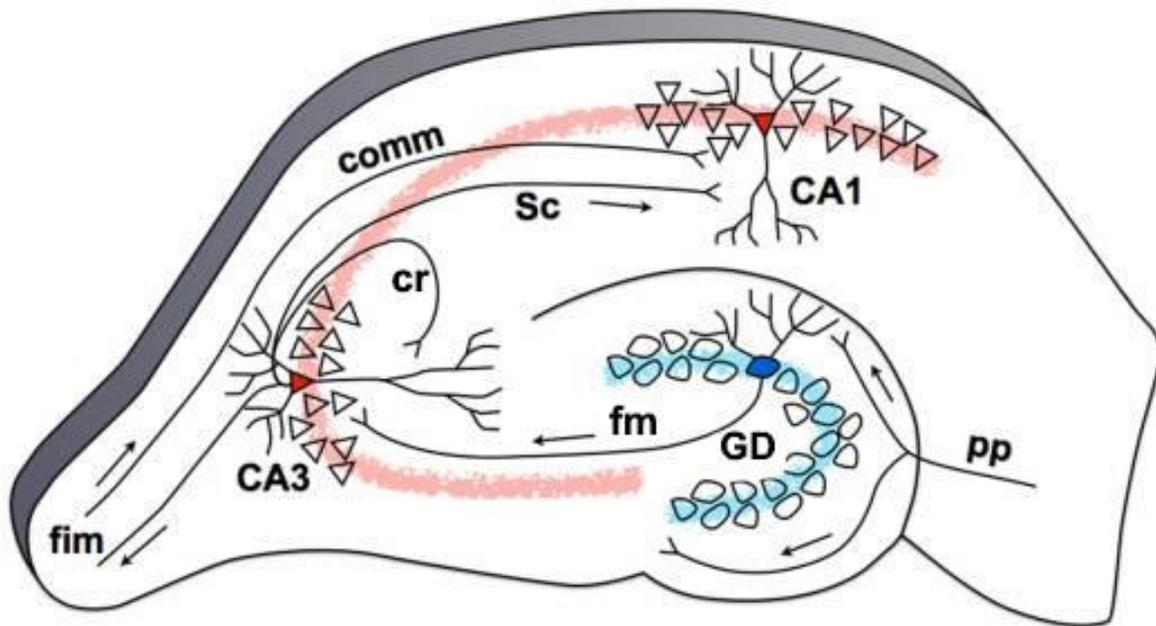


Figura 7. Circuito trisináptico del hipocampo basado en el cerebro de la rata. Las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal se proyectan al DG, sin pasar por el subículo, con colaterales adicionales que se proyectan al subcampo CA3 (vía perforante, pp). Las células granulares del DG proyectan al campo CA3 del hipocampo a través de la vía de las fibras musgosas (fm). Las células piramidales de CA3 proyectan sobre sí mismas a través de colaterales recurrentes (cr) y también hacia CA1 a través de colaterales de Schaffer (Sc). Este circuito trisináptico es principalmente un circuito con muy poca retroalimentación, CA3 envía proyecciones de regreso al DG a través de las células musgosas hiliares (Andersen *et al.*, 2007) (no se muestra). La fimbria/fórnix (fim) es una de las principales vías de salida del hipocampo que también trae entrada comisural (comm) del hipocampo contralateral (modificado de Yassa y Stark, 2011).

El hipocampo recibe información cortical importante de la corteza entorrinal, que se compone de dos regiones cerebrales distintas en ratas. La corteza entorrinal medial, especialmente sus regiones más caudales, está asociada con regiones de

procesamiento espacial del cerebro, como la corteza retroesplenial y el presubículo dorsal (también llamado postsubículo). La corteza entorrinal lateral está asociada con áreas de reconocimiento de elementos de alto orden, como la corteza perirrinal. Ambas regiones reciben información de la corteza prefrontal y la corteza olfativa, y también se envían proyecciones entre sí. Las capas superficiales de la corteza entorrinal medial y la corteza entorrinal lateral se proyectan hacia el hipocampo (en general, la capa II se proyecta hacia DG y CA3, mientras que la capa III se proyecta hacia CA1 y subículo). Las capas profundas reciben retroalimentación del hipocampo. Las conexiones de las capas profundas a las superficiales, así como la presencia de dendritas basales de las neuronas de las capas II y III en las capas profundas, forman un circuito de retroalimentación anatómico crítico que permite que la salida del hipocampo afecte directamente el procesamiento neural de las entradas del hipocampo (Amaral y Witter, 1989).

Como se indicó, anatómicamente hay grandes diferencias en los patrones de conectividad a lo largo del eje longitudinal del hipocampo. La región CA1 forma la salida principal del hipocampo. Se ha identificado que la porción dorsal de CA1 (CA1d) proyecta al subículo y a la corteza entorrinal (Cenquizca y Swanson, 2007), mientras que la región ventral de CA1 (CA1v) proyecta a la corteza prefrontal medial, al NAc, al hipotálamo y amígdala (Friedman *et al.*, 2002; Jay y Witter, 1991; Kishi *et al.*, 2006; Phillipson y Griffiths, 1985).

El CA1 dorsal (septal, caudal en primates), contiene la mayor densidad de células de lugar que codifican la ubicación espacial (Jung *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 1996), que envía proyecciones excitatorias de retroalimentación hacia a las partes dorsales del subículo, presubículo y postsubículo (Amaral *et al.*, 1991; Swanson y Cowan, 1977; Van Groen y Wyss, 2003; Witter y Groenewegen, 1990). Las partes dorsales del complejo subicular contienen la mayoría de las células de "dirección de la cabeza" o "brújula" que codifican la posición de la cabeza en el espacio (Taube, 2007; Taube *et al.*, 1990).

Las proyecciones corticales más prominentes del CA1 dorsal y las partes dorsales del complejo subicular son las cortezas cingulada anterior y retrosplenial en ratas (Cenquizca y Swanson, 2007; Risold *et al.*, 1997; Van Groen y Wyss, 2003; Vogt y Miller, 1983) y monos (Kobayashi y Amaral, 2007; Parvizi *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2007). Estas dos regiones corticales están involucradas principalmente en el procesamiento cognitivo de la información visoespacial y el procesamiento de la memoria (Frankland *et al.*, 2004; Jones y Wilson, 2005; Lavenex *et al.*, 2006) y exploración ambiental (navegación espacial) en ratas (Harker y Whishaw, 2004), monos (Lavenex *et al.*, 2007) y humanos (Maguire, Nannery, *et al.*, 2006; Maguire, Woollett, *et al.*, 2006). Mientras tanto, las partes dorsales (pero no ventrales) de este complejo subicular envían proyecciones paralelas masivas a través del fórnix poscomisural a los núcleos mamilares medial y lateral y al complejo talámico anterior (Ishizuka, 2001; Kishi *et al.*, 2000; Swanson y Cowan, 1975), dos estructuras que contienen la mayoría de las neuronas relacionadas con la navegación (Taube, 2007). A su vez, estas estructuras subcorticales envían sus proyecciones de vuelta al hipocampo dorsal y a la corteza retrosplenial (Risold *et al.*, 1997). Por lo que se ha propuesto que esta red neuronal, compuesta por el CA1-dorsal complejo subicular-cuerpo mamilar: núcleos talámicos anteriores, proporciona la interfaz más importante para registrar un mapa cognitivo para el sistema de navegación/dirección, lo que permite que los animales se orienten y ejecuten correctamente comportamientos en un entorno aprendido (Jeffery, 2007; Muller *et al.*, 1996; Taube, 2007; Taube *et al.*, 1990).

Además, el CA1 y el CA3 dorsales proyectan de manera selectiva a la parte caudal y a la diminuta región dorsal de la zona medial de la parte rostral del núcleo septal lateral que a su vez proyecta al complejo septal medial y al núcleo supramamilar (Risold *et al.*, 1997; Risold y Swanson, 1996), dos estructuras que generan y controlan el ritmo theta del hipocampo activado durante la locomoción voluntaria (Kocsis y Vertes, 1997; Stewart y Fox, 1990). Además, el subículo dorsal y la banda lateral de la corteza entorrinal lateral y media envían proyecciones masivas a la parte rostralateral del núcleo acumbens y caudoputamen rostral (Groenewegen *et al.*, 1996; Naber y Witter, 1998; Swanson y Kohler, 1986). Ambas

estructuras envían proyecciones descendentes directas o indirectamente a través del sustancia innominada (*pallidum* ventral) o del globo pálido (*pallidum* dorsal), para inervar el área ventral tegmental y/o la parte reticular de la sustancia *nigra* (Groenewegen *et al.*, 1996; Groenewegen y Russchen, 1984; Mogenson *et al.*, 1983). El área ventral tegmental juega un papel crítico en la locomoción (Swanson y Kalivas, 2000), mientras que la sustancia *nigra* media los movimientos de orientación de los ojos, la cabeza, el cuello e incluso las extremidades superiores, a través de su proyección masiva a las capas más profundas del colículo superior (Hikosaka y Wurtz, 1983; Werner *et al.*, 1997). En consecuencia, se ha propuesto que estas estructuras, junto con el cuerpo mamilar inmediatamente adyacente en el hipotálamo caudal, componen una "columna de control del comportamiento caudal" que subyace a la expresión del comportamiento exploratorio o de búsqueda de alimento (Swanson, 2000). Juntas, cada una de estas tres estructuras está involucrada en tres aspectos esenciales de la exploración: locomoción (la parte área tegmentaria ventral), orientación de movimientos (sustancia *nigra*) y dirección espacial (cuerpo mamilar).

Por otro lado, la porción ventral, la región CA1 ventral y el subículo ventral comparten una conectividad bidireccional masiva con los núcleos amigdalinos que reciben información sensorial olfatoria accesorio, incluida la amígdala posterior, la cortical posteromedial amigdalina, los núcleos amigdalares basomedial posterior, el área de transición pospiriforme y los núcleos amigdalares mediales (Cenquizca y Swanson, 2007; Kishi *et al.*, 2000; Petrovich *et al.*, 2001; Pitkänen *et al.*, 2000; Saunders *et al.*, 1988; Witter, 2010). Además, el subículo/CA1 ventral y estos núcleos amigdalares también comparten conectividad bidireccional íntima con las cortezas infralímbica, prelímbica e insular agranular (Chiba, 2000; Hoover y Vertes, 2007; Jones y Wilson, 2005; Roberts *et al.*, 2007; Thierry *et al.*, 2000). La estructura hipocampo ventral/subicular-amígdala-corteza prefrontal medial forman una serie de proyecciones descendentes paralelas, ya sea directa o indirectamente a través del septum lateral (partes rostral y ventral), los núcleos de la amígdala medial y central y el núcleo BNST, para inervar las zonas paraventricular y medial del hipotálamo, estructura principal involucrada en el control de las actividades

motoras neuroendocrinas, autonómicas y somáticas (Dong *et al.*, 2001; Dong y Swanson, 2006; Herman *et al.*, 2005; Kishi *et al.*, 2000; Petrovich *et al.*, 2001). En particular el BNST es una estación de retransmisión del hipocampo, fundamental para la regulación de la respuesta al estrés por el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (Choi *et al.*, 2007, 2008; Cullinan *et al.*, 1993) y juega un papel importante en la ansiedad (Walker *et al.*, 2009).

Tanto el CA1 ventral como el subículo envían proyecciones directas al núcleo central de la amígdala (Cenquizca y Swanson, 2007; Kishi *et al.*, 2006), y se ha propuesto que puede tener el potencial de mediar en la contribución del hipocampo ventral al aprendizaje del miedo (Maren y Holt, 2004). Es importante recordar que el CA1 ventral y el subículo también reciben entradas sustanciales de los núcleos amigdalares lateral y basolateral (Petrovich *et al.*, 2001; Pitkänen *et al.*, 2000), que, junto con el núcleo central, son componentes esenciales del condicionamiento del miedo pavloviano (Fanselow y Poulos, 2005; Rodrigues *et al.*, 2009). En resumen, la conectividad del hipocampo ventral lo coloca en una situación idónea para regular el impacto de experiencias emocionales.

2. 3. MARCADORES DE ACTIVACIÓN CELULAR

En el cerebro, la expresión de genes cambia dinámicamente en respuesta a la actividad celular. En la actualidad el empleo de técnicas que permiten la delección de genes así como la reducción o la inhibición de la expresión de los mismos, y los avances metodológicos en la detección de los genes de expresión temprana (IEGs, por sus siglas en inglés, immediate early genes) y proteínas, han permitido estudiar no solo los eventos moleculares que subyacen a la formación de la memoria sino también la organización del trazo de memoria, pues las estructuras cerebrales no trabajan de forma independiente, sino que interactúan entre ellas generando circuitos neuronales dinámicos responsables de las funciones cognitivas.

Los IEGs son rápidamente expresados por patrones de estimulación sináptica, tales como choques electroconvulsivos, inducción de estimulación de alta frecuencia, potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés, long-term

potentiation) y también después de una experiencia conductual (Abraham *et al.*, 1993; Guzowski *et al.*, 1999, 2001; Leslie y Nedivi, 2011; Vann *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2011). Los IEGs pueden ser categorizados en dos clases funcionales: 1) IEGs regulatorios, como los factores de transcripción, los cuales controlan la transcripción de otros genes “río abajo” y 2) IEGs efectores, los cuales influyen directamente en la función celular (Lanahan y Worley, 1998).

Los factores de transcripción son capaces de reclutar la maquinaria transcripcional para iniciar la expresión de los IEGs. El incremento de los niveles de transcripción se puede observar en minutos en simulaciones *in vitro* (Greenberg *et al.*, 1986) e *in vivo* (Guzowski *et al.*, 2001; Vazdarjanova *et al.*, 2002). Los estudios iniciales de los IEGs en el cerebro se centraron en la actividad inducida en los factores de transcripción, tales como c-Fos, c-jun y zif268 (Tischmeyer y Grimm, 1999). Mientras que subsecuentes estudios revelaron que los IEGs codifican proteínas con una gran diversidad de funciones celulares, por lo que fueron llamados IEGs efectores, y algunos de ellos reciben su nombre basado en la proteína que codifican, los cuales que incluyen reguladores de la señalización de proteínas G 2 o *rgs2* (por sus siglas en inglés, regulator of G-protein signaling 2) (Han *et al.*, 2006; Oliveira-dos-Santos *et al.*, 2000), gen asociado al citoesqueleto regulada por actividad o *arc/arg3.1* (por sus siglas en inglés, activity-regulated cytoskeleton-associated) (Rial *et al.*, 2006), proteína de andamio homer 1a o *homer1a* (por sus siglas en inglés, homer scaffolding protein 1) (Sala *et al.*, 2003), activador del plasminógeno tisular o *tPA*, (por sus siglas en inglés, tissue plasminogen activator) (Huang *et al.*, 1996; Qian *et al.*, 1993;), gen que codifica la proteína arcadlina, una proteína similar a la cadherina regulada por actividad o *arcadlin* (activity-regulated cadherin-like protein) (Yasuda *et al.*, 2007), pentraxina regulada por actividad o *narp* (por sus siglas en inglés, neuronal activity-regulated pentraxin) (Chang *et al.*, 2010) y factor neurotrófico derivado del cerebro o *bdnf* (por sus siglas en inglés, brain derived neurotrophic factor) (Cohen-Cory *et al.*, 2010).

2. 3. 1. Proteína c-Fos como marcador de activación celular

Los primeros genes que se encontraron que regulan la actividad en las neuronas fueron inicialmente identificados en células mitóticas como respuesta a señales extracelulares tales como factores de crecimiento y mitógenos, la mayoría de ellos factores de transcripción como c-Fos, c-jun y zif268 (Morgan *et al.*, 1987; Morgan y Curran, 1986; Saffen *et al.*, 1988).

El gen *c-fos* codifica la proteína c-Fos, la cual forma un complejo heterodimérico con la proteína c-Jun para constituir el factor de transcripción activador de la proteína-1 (AP-1) que regula la expresión de genes mediante la unión a secuencias de reconocimiento de AP-1, encontrada en una variedad de genes diana (Fleischmann *et al.*, 2003), los cuales potencialmente median la respuesta a largo plazo de señales que regulan el crecimiento y el desarrollo (Franza *et al.*, 1988). Aunque la expresión de c-Fos ha sido asociada a procesos de división celular, otras señales como la excitación neuronal, tales como la activación de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Greenberg *et al.*, 1986; Morgan y Curran, 1986) y la estimulación por neurotransmisores (Greenberg *et al.*, 1986) también pueden inducir la expresión de esta proteína. En condiciones basales, el ARNm *c-fos* y los niveles de la proteína son bajos (Hughes *et al.*, 1992) y los máximos niveles de ésta pueden ser visualizados entre 1 y 3 h después del tratamiento, y gradualmente disminuyen en el núcleo de las células, entre 4 y 6 h después (Kovács, 2008).

La mutagénesis del promotor *c-fos* reveló que dos elementos son diferencialmente requeridos para activar al promotor en respuesta a una variedad de estímulos (Sheng y Greenberg, 1990). Un elemento “rio arriba” alrededor de los 300 pb del sitio de inicio de transcripción *c-fos* (TSS) es requerido para la inducción de c-fos dependiente del factor de crecimiento y suero; por lo tanto, fue nombrado el elemento de respuesta sérica (SRE) (Sheng *et al.*, 1988; Treisman, 1986). Un segundo elemento, aproximadamente 60 pb “rio arriba” del TSS es requerido para la regulación de *c-fos* dependiente de calcio y de AMPc, el cual es denominado

elemento de respuesta a AMPc/calció (CRE) (Hyman *et al.*, 1988; Sheng *et al.*, 1988). El elemento de regulaci3n de la transcripci3n de *c-fos* es, en el caso de la SRE, la prote3na de uni3n llamada factor de respuesta s3rica (SRF) (Norman *et al.*, 1988). Estudios posteriores demostraron que SRF une la SRE en cooperaci3n con prote3nas adicionales llamadas factores complejo ternario, los cuales son una subfamilia de factores de transcripci3n que contienen 26 dominios E (Ets), como la prote3na Elk-1 (Buchwalter *et al.*, 2004; Dalton y Treisman, 1992), y en el caso de CRE es llamada prote3na de uni3n a elemento de respuesta al AMPc (Montminy y Bilezikjian, 1988).

La r3pida y pasajera expresi3n de c-Fos es asociada con el establecimiento de la memoria de largo plazo de diferentes tareas de aprendizaje (Bertaina-Anglade *et al.*, 2000; Casanova *et al.*, 2016; He *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2013). En condiciones basales, el n3mero de c3lulas positivas a c-Fos es bajo. Sin embargo, algunas estructuras muestran un alto n3mero de c3lulas positivas a c-Fos despu3s de una experiencia de aprendizaje (Bertaina-Anglade *et al.*, 2000; Casanova *et al.*, 2016; He *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2013; Robins *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2011), y algunos autores incluso han observado que esta distribuci3n en la expresi3n de c3lulas positivas a c-Fos puede ser dependiente del paradigma de aprendizaje (Filipkowski *et al.*, 2006; Gill *et al.*, 2007).

La delec3n del gen *c-fos* o la administraci3n de oligos antisentido en el entrenamiento, induce un deterioro de la memoria, sin afectar el proceso de aprendizaje (Fleischmann *et al.*, 2003; Guzowski, 2002), as3 como una reducci3n en la LTP (Fleischmann *et al.*, 2003; Jeffery *et al.*, 1990). Se ha propuesto, adem3s, que una segunda oleada de s3ntesis de c-Fos despu3s de una experiencia de aprendizaje (evitaci3n inhibitoria) es requerida para la formaci3n de memorias persistentes (Gonzalez *et al.*, 2014). Por otro lado, gracias al empleo de optogen3tica, se ha podido etiquetar a las neuronas que son activadas durante una experiencia de aprendizaje, en particular de c3lulas que expresan IEGs, dicho etiquetado permite la expresi3n de un canal i3nico (principalmente permeable a Na+) activado por luz, denominado como canal de rodopsina-2, de tal forma que la

estimulación con luz es suficiente para provocar la recuperación de la memoria (Boyden *et al.*, 2005; Guru *et al.*, 2015; Tonegawa *et al.*, 2015). En un estudio en donde se etiquetaron las células del giro dentado que expresaban *c-fos*, con el canal de rodopsina-2, después del condicionamiento de miedo al contexto, observaron que la subsecuente estimulación con luz azul, inducía la recuperación de la memoria del miedo condicionado (Lui *et al.*, 2012). Además, se propone que dicha proteína regula también la transcripción del gen *mmp 9* (metaloproteinasa 9), importante para la remodelación de espinas dendríticas (Wang *et al.*, 2008) y se ha propuesto que *c-Fos* interacciona con otros factores de transcripción, tales como CREB y Adf1, importantes para incrementar la fuerza sináptica y número de sinapsis (Miyashita *et al.*, 2018; Sanyal *et al.*, 2002).

2. 4. EFECTO DEL ENTRENAMIENTO AVERSIVO INTENSO

Amplia evidencia experimental indica que la interferencia con la actividad fisiológica (mediante la administración intracerebral de inhibidores de la transcripción o traducción, así como la administración de bloqueadores de canales de sodio o antagonistas de receptores colinérgicos o GABAérgicos) de ciertas estructuras cerebrales durante el proceso de consolidación produce deficiencia en la memoria de largo plazo, y se ha asumido que una serie de núcleos cerebrales son esenciales para el establecimiento de la memoria. Sin embargo, pruebas experimentales han demostrado que la administración de un estímulo aversivo intenso o un aumento en el número de sesiones de entrenamiento, protege a la memoria en contra de los efectos de agentes amnésicos administrados en diversas estructuras cerebrales, tales como el estriado (Giordano y Prado-Alcalá, 1986; González-Franco *et al.*, 2019; Pérez-Ruiz y Prado-Alcalá, 1989; Salado-Castillo *et al.*, 2011), sustancia *nigra* (Cobos-Zapiaín *et al.*, 1996; Salado-Castillo *et al.*, 2011), amígdala (Martínez-Moreno, 2013; Parent *et al.*, 1995; Parent y McGaugh, 1994; Salado-Castillo *et al.*, 2011; Thatcher y Kimble, 1966), hipocampo (Garín-Aguilar *et al.*, 2014; Medina *et al.*, 2019; Quiroz *et al.*, 2003; Salado-Castillo *et al.*, 2011) y corteza insular (Muñoz, 2012). La visión de que la consolidación de la memoria está mediada por un conjunto más o menos rígido de sistemas de neurotransmisores y de

estructuras cerebrales particulares, no es apoyada por los datos experimentales antes mencionados. Por el contrario, parece ser que la consolidación de la memoria es un proceso muy dinámico, que se apoya en una interacción compleja de mecanismos cerebrales, no del todo conocidos.

Además del efecto protector de la memoria antes mencionado, se ha reportado que sujetos entrenados con un estímulo aversivo intenso en la tarea de evitación inhibitoria muestran una mayor persistencia de la memoria comparada con los grupos entrenados con menores intensidades de choque. En un estudio hecho por Gonzalez *et al.* (2014) observaron que solo en los sujetos entrenados con la intensidad más alta de choque eléctrico, la memoria que puede persistir hasta 14 días después del entrenamiento, es decir, recuerdan mejor ese aprendizaje. En nuestro laboratorio, hemos encontrado que cuando se entrenan ratas administrándoles una intensidad alta de choque eléctrico, estas muestran también un incremento en la persistencia de la memoria, en comparación con ratas que recibieron un choque de menor intensidad, al ser evaluadas en una prueba de extinción, la cual es definida como la disminución de una respuesta condicionada en ausencia del estímulo incondicionado o reforzador (choque eléctrico), y es utilizada como medida de la fuerza del aprendizaje. De tal forma que se ha observado que los sujetos entrenados con la intensidad de choque alta muestran una mayor resistencia a la extinción al ser comparada con los sujetos entrenados con la intensidad baja de choque (Bello-Medina *et al.*, 2016; Garín-Aguilar *et al.*, 2012).

Hasta el momento es poco lo que se conoce acerca del fenómeno del entrenamiento aversivo intenso. Pero a continuación se mencionarán algunos estudios que han aportado información acerca de lo que subyace a este fenómeno.

Desde hace ya algunos años se ha propuesto que los mecanismos por los cuales la memoria se adquiere y se almacena en el cerebro involucran modificaciones en la plasticidad sináptica (Ramón y Cajal, 1893). Las espinas dendríticas, son pequeñas proyecciones de las dendritas y representan un medio por

el cual se pueden establecer nuevos contactos entre células y fortalecer contactos sinápticos existentes (Leuner *et al.*, 2003). Las espinas dendríticas vienen en una variedad de tamaños y formas, y comúnmente son clasificadas como delgadas, cortas y de tipo hongo. Existe también evidencia que indica que las espinas pequeñas son sitios preferenciales para la inducción de potenciación a largo plazo, mientras que las grandes son más estables y muestran menos plasticidad (Bourne y Harris, 2007; O'Donnel *et al.*, 2011), es decir que podrían representar huellas físicas de la memoria a largo plazo (Tada y Sheng, 2006).

En un estudio hecho en nuestro grupo de trabajo, Bello-Medina *et al.* (2016) reportaron un aumento en la densidad de espinas dendríticas de tipo hongo, en las neuronas medianas espinosas del estriado dorsomedial, pero no en el estriado dorsolateral. La cuantificación de las espinas se realizó 24 horas después de un entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria en un grupo de sujetos sometidos a un entrenamiento incrementado comparado con un entrenamiento moderado. Lo anterior, sugiere que el aumento en la densidad de espinas tipo hongo producida por un entrenamiento intenso fortalece la consolidación de la memoria y facilita la transferencia de información desde el cuerpo estriado dorsal a otras regiones cerebrales.

Por otro lado, se ha demostrado que ciertos niveles de glucocorticoides facilitan la consolidación de la memoria de los eventos asociados con un estímulo estresante (Cordero y Sandi, 1998; Roozendaal, 2002), y este efecto depende de la unión de la hormona con el receptor a glucocorticoides, el cual, al estar acoplado con su ligando, sufre modificaciones post-traduccionales en residuos de aminoácidos entre los que se encuentra la serina 232 en ratas. La fosforilación en este sitio induce la activación del receptor para funcionar como un factor de transcripción (Wang *et al.*, 2008). Se ha propuesto que estos receptores median la formación de la memoria a largo plazo mediante el reclutamiento de vías dependientes de la proteína cinasa II alfa dependiente de calcio y calmodulina o CaMKII α (por sus siglas en inglés, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II Alpha) y CREB, e indican el incremento de otras proteínas como la subunidad

GluA1 de receptores AMPA y la proteína asociado al citoesqueleto regulada por actividad o Arc (por sus siglas en inglés, activity-regulated cytoskeleton-associated protein), las cuales se han relacionado con procesos de plasticidad sináptica (Chen *et al.*, 2012). En un estudio hecho González-Franco *et al.* (2023) se cuantificaron células positivas al receptor a glucocorticoides fosforilado en la serina 232 en la región del caudado-putamen de grupos independientes de ratas entrenadas en una tarea de evitación inhibitoria con un choque eléctrico bajo, moderado y alto. Los resultados indicaron que el grupo de ratas que fue sometido al nivel de entrenamiento más alto mostró un incremento significativo en el número de células positivas a receptor a glucocorticoides fosforilado específicamente en la región ventral del caudado-putamen y en un efecto similar fue observado también en la región de CA1 del hipocampo de ratas con los sujetos entrenados con la intensidad más alta de choque. Los autores propusieron que este incremento en la fosforilación de este receptor puede contribuir al fortalecimiento de la memoria, facilitando la consolidación a través de la modulación de mecanismos moleculares como la expresión de genes asociados con la actividad neuronal y la plasticidad sináptica.

Particularmente también en la región del caudado-putamen en un estudio hecho por González- Franco *et al.* (2017) observaron un mayor número de células activas, positivas a la proteína Arc. Este aumento fue observado en las porciones ventrales de la región del estriado (caudado-putamen) de sujetos que fueron entrenados con una alta intensidad de choque eléctrico en la tarea de EI en comparación con los grupos entrenados con intensidades más baja de choque eléctrico. En conclusión, los autores sugirieron que este aumento en el número de células activas en estos sitios puede deberse a las características anatómicas y funcionales del estriado, ya que en particular la porción ventral se comunica con la corteza insular que participa en asociaciones de motivación aversiva. Además, la amígdala, que también desempeña un papel importante en los aprendizajes emociones, proyecta hacia estas porciones ventrales del estriado a través de vías directas e indirectas (McDonald, 1991; Krettek y Price, 1977).

En regiones como la amígdala y el hipocampo, los eventos moleculares involucrados en la formación de la memoria de un entrenamiento aversivo intenso en EI han sido aún menos estudiados en comparación con la región del estriado, por lo cual se planteó la siguiente justificación.

3. JUSTIFICACIÓN

Durante muchos años, los estudios realizados para entender del efecto protector de la memoria inducido por un entrenamiento aversivo intenso se encaminaron en realizar interferencias farmacológicas, con la finalidad de elucidar las posibles estructuras cerebrales involucradas en la formación de la memoria de este tipo de entrenamiento; los resultados parecían sugerir que ninguna de estas estructuras desempeñaba un papel esencial en la formación de la memoria relacionada con este tipo de entrenamiento, incluyendo el hipocampo y la amígdala. Por lo cual las investigaciones posteriores se encaminaron a estudiar los eventos moleculares que subyacen a este fenómeno en animales intactos. En particular, en un estudio previo, que constituye un antecedente importante para esta investigación, se observó que en el caudado-putamen un mayor número de células activas es reclutado en las porciones ventrales de esta región, después de que los sujetos son entrenados con un estímulo aversivo intenso en comparación con un entrenamiento aversivo moderado en la tarea EI. Sin embargo, hasta el momento han sido poco los estudios que han explorado cómo es la distribución regional de las células activadas en la amígdala y el hipocampo, estructuras involucradas en la formación de la memoria, después de un entrenamiento aversivo intenso en la tarea de EI y si ésta es similar o diferente comparada con un entrenamiento aversivo moderado. Esto nos ayudaría a aportar información para entender los procesos de formación de la memoria de un entrenamiento aversivo intenso, ya que se ha sugerido que posibles cambios funcionales producidos por el entrenamiento intenso podrían ser mecanismos subyacentes a su efecto protector frente a tratamientos amnésicos.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el porcentaje de células c-Fos positivas en la amígdala y el hipocampo en condiciones de entrenamiento intenso y moderado.

5. HIPÓTESIS

H1: El porcentaje de células c-Fos positivas será significativamente mayor en la amígdala, en la condición de entrenamiento aversivo intenso en comparación con un entrenamiento moderado.

H2: El porcentaje de células c-Fos positivas será significativamente mayor en el hipocampo, en la condición de entrenamiento aversivo intenso en comparación con un entrenamiento moderado.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos fueron realizados siguiendo las directrices del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (Protocolo 27 Neurobiología del aprendizaje y la memoria) y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (2001) referentes al uso y al manejo de animales de experimentación, así como la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del National institutes of health (National Research Council, 2011).

6. 1. Animales

Se emplearon 66 ratas macho de la cepa Wistar, con un peso entre 250 y 350 g obtenidas del Bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM. Los animales ingresaron al bioterio del laboratorio de Aprendizaje y Memoria y allí se mantuvieron durante todo el experimento en cajas individuales en condiciones controladas de temperatura de 23 ± 1 °C, con un periodo de luz-oscuridad de 12/12 h, iniciándose a las 7:00 A.M. y con libre acceso a comida y agua. El entrenamiento y las pruebas de retención fueron llevados a cabo durante la fase de luz del ciclo, entre las 9:00 y 14:00 h. Las ratas fueron asignadas aleatoriamente a cada grupo. Antes de

comenzar los experimentos, los sujetos recibieron sesiones de manipulación de 5 min durante tres días consecutivos antes de ser entrenados en la tarea.

Debido a que el objetivo del presente estudio fue evaluar los posibles cambios en la expresión de la proteína c-Fos, después de un entrenamiento con una intensidad moderada y alta de choque eléctrico, fue importante demostrar que el entrenamiento con un choque eléctrico alto producía un aprendizaje más fuerte que el producido por el entrenamiento moderado. Para esto en 10 sujetos por grupo se midió la extinción de la tarea durante ocho días (E1-E8). Los sujetos entrenados recibieron un choque eléctrico de 1.0 mA o 3.0 mA y un grupo control fue añadido al análisis, el cual fue expuesto al contexto sin la administración del choque eléctrico (0.0 mA) (Figura 8), más detalles podrán ser revisados en la sección de procedimiento conductual. Mientras que para los análisis histológicos de cinco a seis sujetos por grupo fueron empleados para un análisis de inmunofluorescencia. El número de células c-Fos positivas se contó en la amígdala e hipocampo después de un entrenamiento moderado (1.0 mA) e intenso (3.0 mA), en ambas condiciones los sujetos fueron perfundidos 90 minutos después del entrenamiento y se añadieron tres grupos controles, que se describirán con más detalle más adelante: un grupo control de vida (grupo Bio), un grupo se fue expuesto al contexto sin la administración del choque eléctrico (0.0 mA). El tercero fue un grupo control de choque de 3.0 mA (grupo SC-3). Adicionalmente, un cuarto grupo de control de choque de 1.0 mA, fue añadido únicamente para la región del hipocampo debido a los resultados obtenidos (grupo SC-1) (Figura 9).

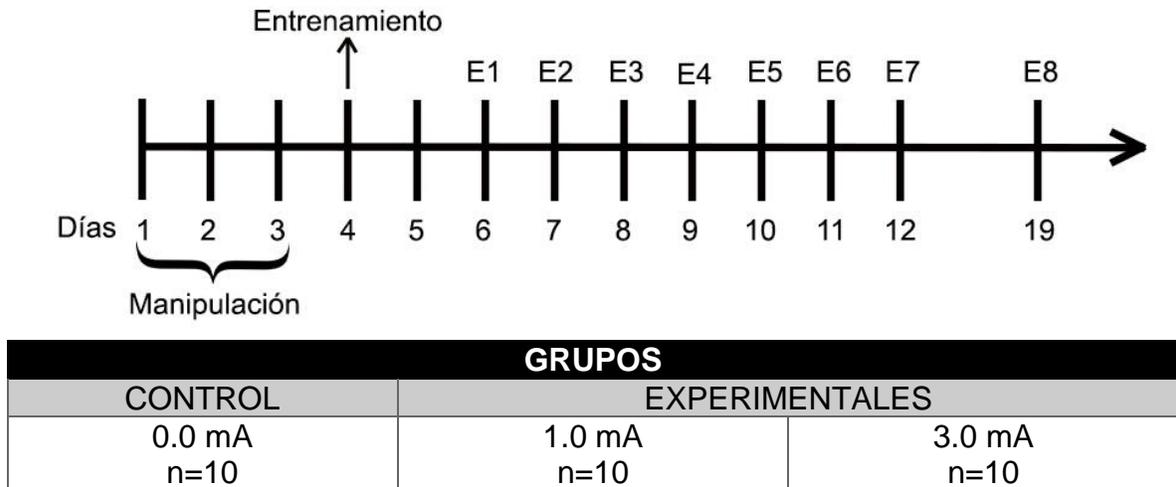


Figura 8. Diseño experimental de la prueba de extinción. En la parte superior se muestra la línea temporal del desarrollo del experimento. En la parte inferior se observa el diseño experimental y n utilizada en cada uno de los grupos.

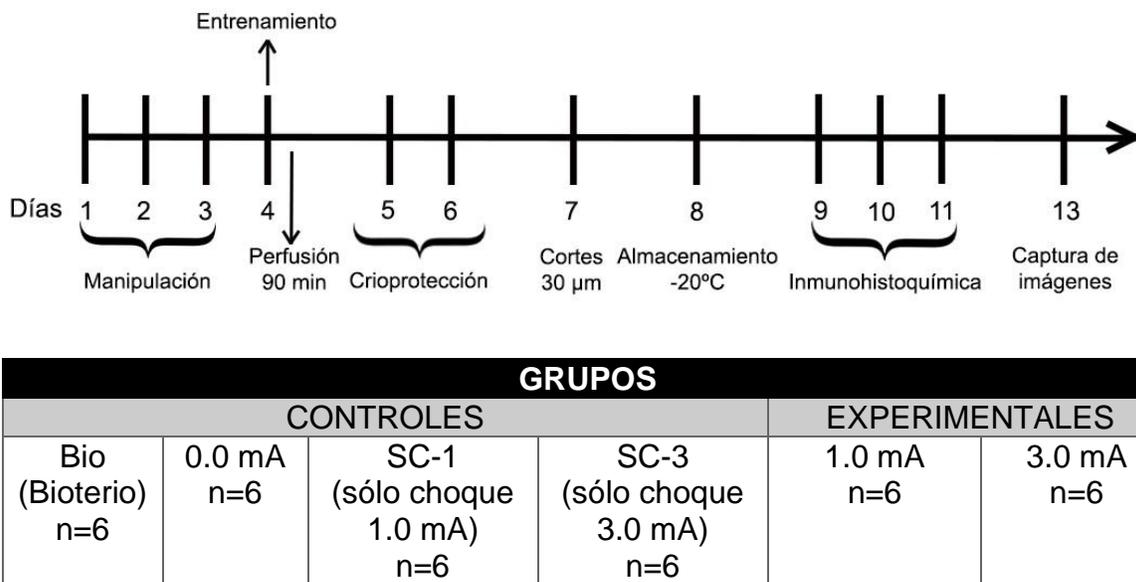


Figura 9. Diseño experimental histología. En la parte superior se muestra la línea temporal del desarrollo del experimento. En la parte inferior se observa el diseño experimental y n utilizada en cada uno de los grupos.

6. 2. Procedimiento conductual

6. 2. 1. Aparatos

La cámara de evitación inhibitoria (EI), está compuesta por dos compartimentos del mismo tamaño (30 cm x 30 cm x 30 cm) separados por una

puerta deslizante. El compartimento de seguridad está iluminado por un foco de 10 watts colocado en la tapa del compartimento y tiene una rejilla en el piso. El compartimento de castigo, de 30 cm de longitud, es oscuro y sus paredes laterales de acero inoxidable tienen forma de V, las cuales llegan al piso del compartimento, estando separadas en este lugar por una distancia de 1.5 cm (justo a la mitad del compartimento) (Figura 10). Estas láminas pueden electrificarse con un estimulador de pulsos cuadrados (Grass Modelo No. S-48) acoplado a una unidad de corriente constante (Grass Modelo No. CCU-1A). La duración de la aplicación de los estímulos, las latencias de entrada, escape y retención fueron medidas automáticamente con ayuda de una computadora. La cámara de evitación inhibitoria está ubicada en un cuarto sonoamortiguado.

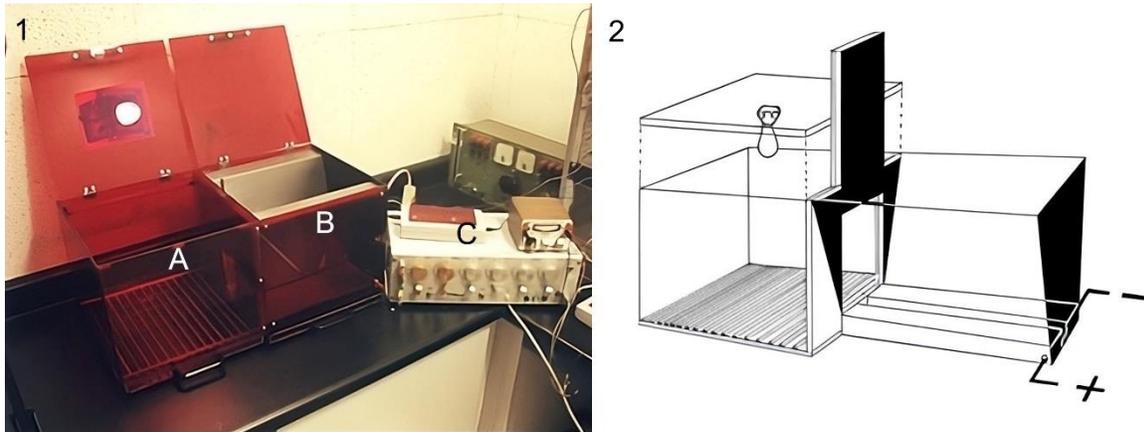


Figura 10. Cámara de evitación inhibitoria. 1. Fotografía. A. Compartimento de seguridad (iluminado). B. Compartimento de castigo (oscuro). C. Estimulador. 2. Representación esquemática.

6. 2. 2. Entrenamiento

Cada rata fue colocada en el compartimento de seguridad y 10 s después se abrió la puerta deslizante; una vez que el animal pasó al compartimento de castigo se cerró la puerta y se administró un choque eléctrico de 1.0 mA o 3.0 mA. Transcurridos 5 s después del inicio de la administración del choque se abrió la puerta, permitiendo al sujeto escapar al compartimento de seguridad en donde permaneció durante 30 s antes de ser regresado a su caja-habitación. Se registró el tiempo transcurrido entre la colocación de la rata en el compartimento de

seguridad y el momento en el que ingresó al compartimento de castigo (latencia de entrada), así como el tiempo en que tardó en regresar del compartimento de castigo al de seguridad durante la administración del choque eléctrico (latencia de escape).

En algunos experimentos, 90 min después de la sesión de entrenamiento de cinco a seis sujetos por grupo fueron empleados para un análisis inmunohistológico y 10 sujetos por grupo se estudiaron más a fondo.

6. 2. 3 Extinción

Cuarenta y ocho horas después del entrenamiento, se midió la extinción de la tarea durante siete días consecutivos (E1-E7). Debido a que queríamos investigar si un entrenamiento intenso produciría una resistencia duradera a la extinción, se llevó a cabo una sesión de extinción adicional al decimoquinto día después del entrenamiento (E8). Durante las sesiones de extinción se siguió el mismo procedimiento de entrenamiento, excepto que no se administró el choque; en estas sesiones se registró la latencia de retención, que es el tiempo que el animal tarda en pasar del compartimento seguro al de choque. Si el sujeto no cruzó en 600 segundos al compartimento de castigo, se dio por terminada la sesión y se le asignó una latencia de retención de 600 segundos.

6. 3. Histología

6. 3. 1. Inmunofluorescencia

El número de células c-Fos positivas se contó en la amígdala e hipocampo después de un entrenamiento moderado (1.0 mA) e intenso (3.0 mA), en ambas condiciones los sujetos fueron perfundidos después del entrenamiento y se añadieron tres grupos controles: el primero de ellos fue mantenido bajo idénticas condiciones de vida a la de los animales utilizados para el estudio conductual, pero nunca abandonaron el bioterio, excepto para la perfusión (grupo Bio). El segundo grupo de animales fue sometido al mismo procedimiento de entrenamiento, excepto que el choque eléctrico no fue administrado (grupo 0.0 mA, Contexto). El tercer

grupo de animales se introdujo directamente en el compartimento de castigo y allí recibió un choque eléctrico inescapable de 3.0 mA (grupo SC-3). Adicionalmente, se estudió un cuarto grupo control que solo recibió la administración de un choque eléctrico 1.0 mA de la media de la duración del choque que recibió el grupo que fue entrenado con 1.0 mA (grupo SC-1); este grupo fue añadido únicamente para la región del hipocampo debido a los resultados obtenidos, que se visualizarán más adelante.

Las ratas de cada grupo fueron perfundidas 90 min después del entrenamiento o después del procedimiento conductual y sus cerebros fueron procesados con la inmunofluorescencia para la detención de la proteína c-Fos en los núcleos central (CE), lateral (LA) y basolateral (BL) de la amígdala; CA1, CA3 y giro dentado (GD) del hipocampo, anatómicamente definidas por Paxinos y Watson (2007). Para la inmunohistoquímica, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (100 mg/kg) y se perfundieron con 150 ml de solución salina al 0.9%, seguido de 200 ml de paraformaldehído al 4% en buffer de fosfato 0.1 M a través de la aorta ascendente. Los cerebros fueron extraídos y post-fijados en la misma solución por 3 horas; pasado este tiempo fueron transferidos a sacarosa al 15% en buffer de fosfato y permanecieron ahí toda la noche a 4 °C, y posteriormente a sacarosa al 30%. Cuatro secciones coronales de 30 µm que contenían la amígdala (bregma de -2,40 a -3,36 mm) y el hipocampo (bregma de -2,92 a -3,84 mm), se cortaron con la ayuda de un criostato Leica CM1850. Las secciones fueron colectadas y almacenadas en una solución crioprotectora (sacarosa al 15%, etilenglicol al 30% v/v en buffer de fosfato 0.1 M) a -20°C hasta su posterior procesamiento en la inmunohistoquímica de fluorescencia. Las secciones fueron lavadas en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se incubaron en H₂O₂ al 3% y luego se lavaron con PBS. Seguida por borhidrato de sodio al 1% (Sigma-Aldrich) y posteriormente con buffer de bloqueo (que contenía suero normal de cabra (NGS) al 5% (Jackson ImmunoResearch), tritón al 1% X-100 (Merck) disuelto en buffer de bloqueo del kit tyramide signal amplification (TSA) (PerkinElmer Life Sciences) por 60 min. Las secciones fueron incubadas a 4°C con un anticuerpo primario policlonal de conejo contra c-Fos (1:2000; abcam) durante 48 horas. Posteriormente estas fueron

lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado (1:200; Vector Laboratories) por 60 min a temperatura ambiente, las secciones fueron lavadas en PBS y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente en reactivo de amplificación avidina-biotina (Vectastain, Vector Laboratories). La tinción fue visualizada usando FITC (TSA fluorescence system, Perkin Elmer Life Sciences), los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (1:5000; Sigma-Aldrich) para visualizar los núcleos y como referencia anatómica. Las secciones fueron montadas en laminillas gelatinizadas y cubiertas con medio de montaje (vectashield, Vector Laboratories) para prevenir el fotoblanqueo.

6. 3. 2. Análisis de imágenes

Se adquirieron treinta imágenes en el eje z (z-stack) de cada una de las regiones de ambos hemisferios, con una separación de 1 μm entre cada imagen. Estas imágenes se capturaron utilizando un objetivo de 40x (0.8 NA) en un microscopio de fluorescencia equipado con un sistema Apotome (Carl Zeiss Imager Z1 acoplado a una cámara AxioCamMR3). En cada laminilla, los parámetros para la adquisición de las imágenes fueron establecidos a partir del corte un animal del grupo Bio; una vez que se establecieron estos parámetros, se mantuvieron constantes para los cortes de cerebro de cada uno de los otros grupos contenidos en la laminilla (González- Franco *et al.*, 2017). El análisis de la expresión de c-Fos se realizó en las imágenes usando el software ImageJ. El método empleado para el conteo células fue reportado previamente por Vazdarjanova *et al.* (2002). Solo se incluyeron en los análisis las células que eran putativamente neuronas, con núcleos grandes ($\sim 10\text{--}15 \mu\text{m}$ de diámetro) teñidos difusamente con DAPI, y que se encontraban en el medio del 60% del z-stack (esta medida estereológica se utilizó para minimizar los errores de muestreo atribuibles a células incompletas), el volumen de análisis por cada z-stack fue de 1339 mm^3 . Se consideraron como células positivas aquellas en donde la señal de c-Fos abarcaba al menos 50% del núcleo y se mantenía visible en al menos tres planos de la imagen del z-stack. Es importante destacar que en futuras investigaciones es necesario el empleo de marcadores específicos para neuronas o glía para poder discernir específicamente

posibles cambios en actividad en estos tipos celulares, pues el conteo por tamaño de núcleo no garantiza tal diferenciación, por lo cual los resultados fueron expresados en porcentaje de células positivas a c-Fos.

6. 4. Análisis estadísticos

En virtud de la naturaleza de los datos obtenidos, los resultados conductuales fueron analizados con pruebas no paramétricas. La principal medición derivada de la tarea de evitación inhibitoria fue la de la retención, ya que es la que permite medir los efectos de los tratamientos sobre la consolidación de la memoria y sobre la extinción de esa memoria. Para medir estas dos variables dependientes, se estableció un punto de corte arbitrario de 600 s, lo que impide que los resultados tengan una distribución normal, que es el requisito fundamental para poder aplicar pruebas paramétricas. Por lo tanto, las pruebas no paramétricas son las más adecuadas para hacer inferencias derivadas del tipo de datos obtenidos en la parte conductual de esta tesis. Los resultados de las latencias de entrenamiento, escape y de retención entre grupos (0.0 mA, 1.0 mA y 3 mA) para cada día de extinción fueron analizados de manera independiente con la prueba de Kruskal-Wallis. Para analizar las diferencias entre las sesiones de un mismo grupo a lo largo de los 8 días de extinción se utilizó una prueba de Friedman. Cuando fue apropiado, para la comparación múltiple por pares se empleó la prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Dunn.

En cuanto al análisis de los porcentajes de células que expresan c-Fos $[(\text{Total de células positivas a c-Fos} / \text{Total de células}) \times 100]$, se aplicaron pruebas paramétricas (ANOVA de una vía o de dos vías; cuando los valores de p fueron menores a 0.05, se procedió a aplicar la prueba post hoc de Bonferroni). Para utilizar este tipo de pruebas se debe cumplir, rigurosamente, con el requisito de distribución normal de los datos y con homogeneidad de varianzas. La prueba de Shapiro-Wilk y de Levene demostró que los datos relativos a los porcentajes de células estudiadas cumplen con ambos requisitos.

7. RESULTADOS

7. 1. Conductuales

Debido a que uno de los principales objetivos de este estudio fue evaluar los posibles cambios en la expresión de la proteína c-Fos en condiciones de entrenamiento moderado e intenso en una tarea EI, fue necesario definir operacionalmente el entrenamiento “moderado” e “intenso”. Para este fin, medimos el efecto de la administración de los choques 1.0 mA y 3.0 mA durante el entrenamiento en la tarea de EI sobre la resistencia a la extinción, que es una disminución progresiva en la magnitud de una respuesta condicionada que ya no se refuerza. Se usa como una medida de la fuerza del aprendizaje ya que la resistencia a la extinción es más fuerte cuando la experiencia de aprendizaje también es más fuerte.

La prueba Kruskal-Wallis mostró que no había diferencias significativas entre los grupos con respecto a las latencias de entrenamiento ($H(2) = 1.36$, $p = 0.507$), pero indicó diferencias significativas entre los grupos en las latencias de escape ($H(2) = 31.97$, $p < 0.0001$); esperábamos que los grupos de 1.0 y 3.0 mA mostraran latencias de escape más bajas que el grupo Contexto (0.0 mA) debido a que los sujetos de esos grupos estaban motivados para escapar de la estimulación aversiva. De hecho, este fue el caso. El grupo Contexto tuvo una latencia de escape más alta que los grupos de 1.0 y 3.0 mA ($p = 0.0001$ para cada comparación), mientras que esta latencia no difirió entre los dos últimos grupos (prueba de Dunn), como se muestra en Figura 11. A y B. Mediana y rango intercuartil de la latencia de entrenamiento: 0.0 mA, 23.91 s (10.73 a 40.7); 1.0 mA, 27.7 s (10.25 a 32.5); y 3.0 mA, 29.8 s (16.25 a 59.6).

Al analizar las latencias de retención de cada grupo a lo largo de las ocho sesiones de extinción, la prueba de Friedman mostró diferencias significativas en el grupo Contexto ($Q(7) = 15.86$, $p = 0.026$); la prueba de comparaciones múltiples de Dunn reveló solo una pequeña reducción significativa en la latencia de retención entre la séptima sesión (E7) y la primera sesión (E1) ($p < 0.01$), lo cual no constituye

un reflejo en la conducta de extinción, debido a que los sujetos de este grupo no recibieron la administración de un choque eléctrico durante el entrenamiento. En el caso del grupo 1.0 mA la prueba de Friedman también arrojó una diferencia significativa entre las sesiones de extinción ($Q(7) = 46.19, p < 0.0001$). La prueba de Dunn indicó reducciones significativas en las latencias de retención al comparar E1 con E6, E7, y E8 ($p < 0.01, < 0.001, \text{ and } < 0.01$, respectivamente). Con respecto al grupo de 3.0 mA, no hubo diferencias significativas entre las sesiones de extinción ($Q(7) = 9.77, p = 0.202$). Mediana y rango intercuartil de la latencia de escape: 0.0 mA 29.1 s (19.14 a 35); 1.0 mA, 1.6 s (0.92 a 4); y 3.0 mA, 1.2 (0.42 a 2.95). (Figura 11. C).

La prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre los grupos en cada una de las ocho sesiones de extinción ($H(2) = 22.09$ a 25.00 para todas las sesiones, $p < 0.0001$ para cada sesión). La prueba de comparación múltiple de Dunn reveló que el grupo de contexto tenía latencias significativamente más bajas en comparación con el grupo de 1.0 mA en la primera ($p < 0.001$), segunda ($p < 0.001$), tercera ($p < 0.01$), y cuarta ($p < 0.01$) sesiones de extinción; también difirió con el grupo de 3.0 mA en las ocho sesiones de extinción ($p < 0.0001$ para cada comparación). Por último, el grupo de 1.0 mA tuvo latencias de retención más bajas que el grupo de 3.0 mA en las últimas cuatro sesiones de extinción ($p < 0.05$ para cada comparación). Mediana de la latencia de retención: 0.0 mA, E1: 25.2 s (19.45 a 32.6); E2: 15.28 s (4.4 a 24.53); E3: 8.9 s (6.63 a 16.05); E4: 11.45 s (4.95 a 20.68); E5: 9.0 s (4.72 a 27); E6: 9.25 s (5.6 a 13.48); E7: 7.6 s (3.7 a 16.7); E8: 7.9 s (5 a 26.6). 1.0 mA, E1: 600 s (482.2 a 600); E2: 600 s (246.2 a 600); E3 8.9 s (6.63 a 16.05); E4: 11.45 s (4.95 a 20.68); E5: 9 s (4.72 a 27); E6: 9.25 s (5.6 a 13.48); E7: 7.6 s (3.7 a 16.7); E8: 7.9 s (5 a 26.6). 3.0 mA, E1- E5: 600 s (600 s a 600 s); E6: 600 s (525.9 a 600); E7: 600 s (541.1 a 600); E8: 600 s (446.4 a 600) (Figura 11. C).

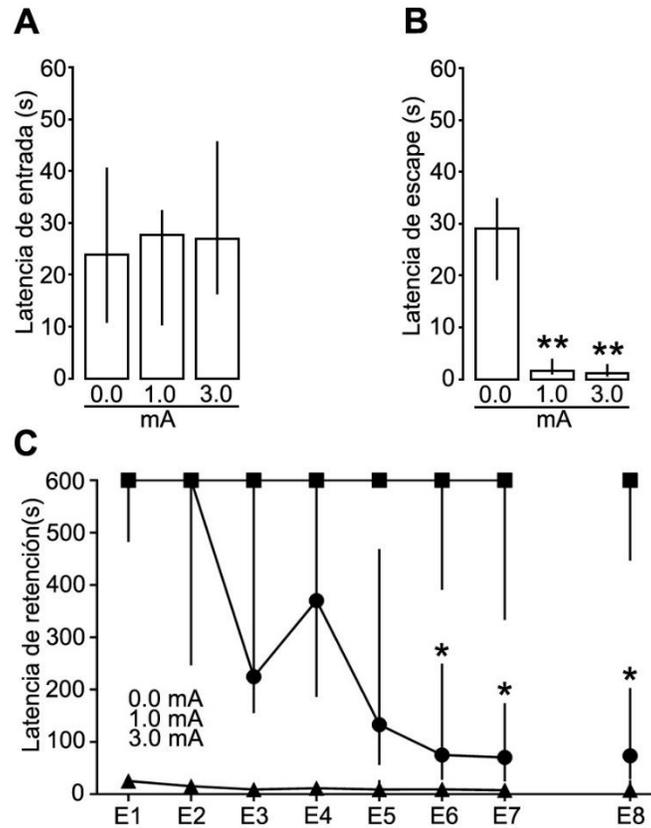


Figura 11. El entrenamiento aversivo intenso produjo una mayor resistencia a la extinción que el entrenamiento moderado. Mediana de las latencias (\pm rango intercuartilar) de los grupos de ratas entrenadas en evitación inhibitoria con 0.0 (grupo de contexto), 1.0 o 3.0 mA. (A) latencias de entrenamiento. (B) Latencias de escape. (C) Latencias de retención a lo largo de las sesiones de extinción diarias (E1–E7) y la sesión adicional ejecutada 15 días después del entrenamiento (E8). (B) ** $p < 0.0001$ vs 0.0 mA. (C) * $p < 0.05$ vs E1 en el grupo 1.0 mA. (A) y (B) $n = 16$ ratas por grupo; (C) $n = 10$ ratas por grupo; ver texto para más detalles.

7. 2. Análisis histológico

7. 2. 1. Amígdala

La inmunotinción de c-Fos se examinó 90 min después del entrenamiento de EI con un choque eléctrico moderado (1.0 mA) o intenso (3.0 mA). Estos grupos se compararon con los grupos Bio, SC-3 y Contexto. La Figura 12 muestra ejemplos de microfotografías de inmunotinción de c-Fos y detección de DAPI.

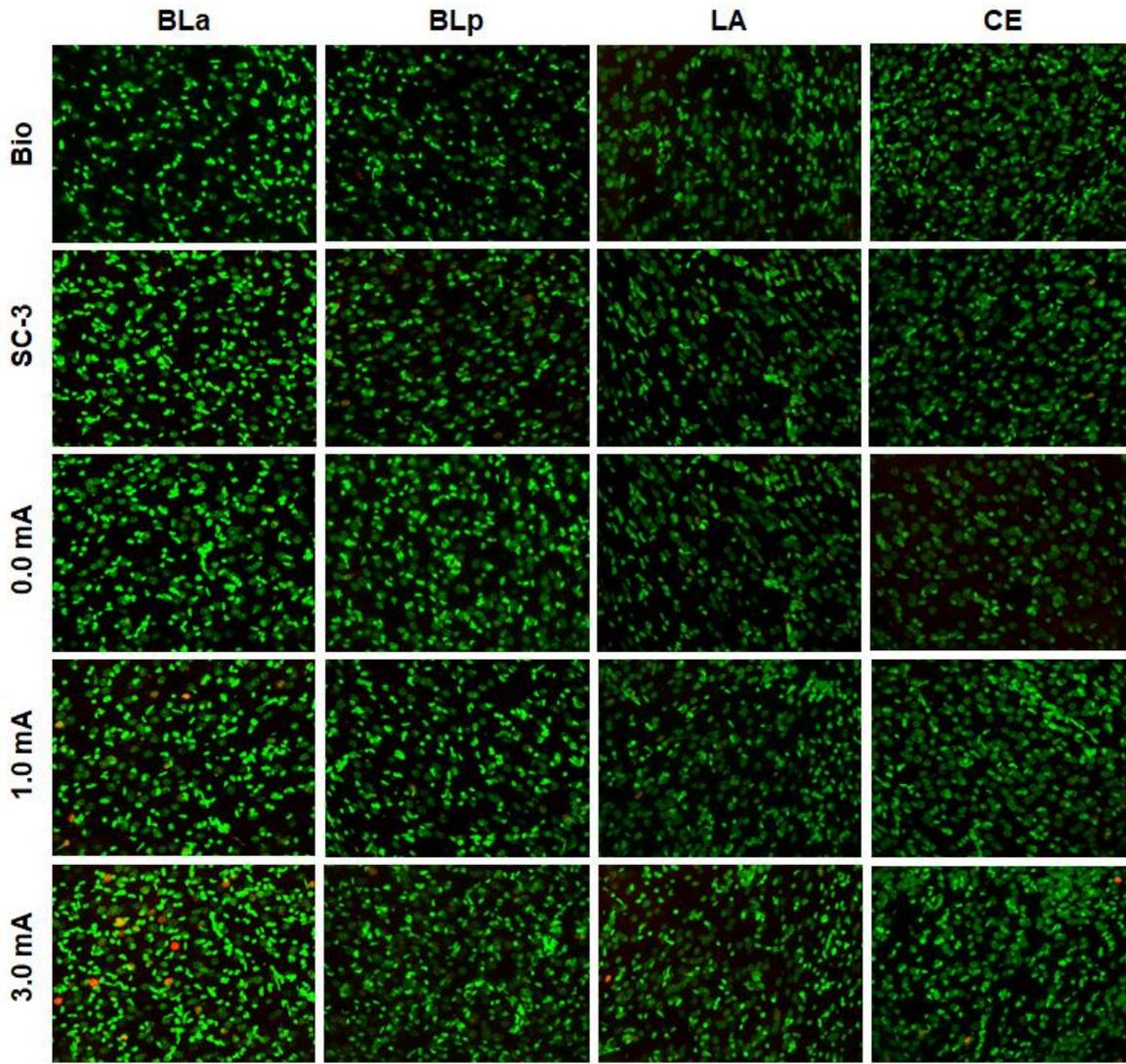


Figura. 12. Imágenes representativas de las porciones BLa, BLp, LA y CE de la amígdala, de cada una de las condiciones de tratamiento: Bio, Solo choque de 3.0 mA (SC-3) y entrenado con 0.0 (contexto), 1.0 o 3.0 mA, que muestran la inmunotinción de c-Fos, contrateñida con DAPI para la detección de núcleos y la colocación de c-Fos y núcleos. La inmunotinción de c-Fos y DAPI se coloreó de rojo y verde, respectivamente, independientemente del marcaje fluorescente nativo. Barra de escala = 50 μ m.

7. 2. 1. 1. Amígdala Basolateral

El ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del tratamiento en el porcentaje de células que expresan c-Fos después del entrenamiento en EI ($F(4,25) = 6.631$, $p = 0.0009$). El análisis post-hoc (prueba de Bonferroni) mostró un mayor porcentaje de células que expresan c-Fos en el grupo de 3.0 mA, cuando se

comparó con los grupos Bio ($p < 0.001$), Contexto ($p < 0.05$) y 1.0 mA ($p < 0.05$), pero no difirió significativamente del grupo SC-3. El promedio de porcentaje de células que expresan c-Fos \pm SEM: Bio, $0.48\% \pm 0.23$; SC-3, $1.72\% \pm 0.24$; Contexto, $1.22\% \pm 0.43$; 1.0 mA, $1.36\% \pm 0.52$; y 3.0 mA, $2.90\% \pm 0.50$ (Figura 13. B).

Dado este resultado, y debido a la extensa literatura que muestra que la amígdala basolateral está involucrada en la consolidación de la memoria de EI (Roosendaal y McGaugh, 1996, 1997b, 2011), decidimos explorar sus zonas anterior (BLa) y posterior (BLp).

El ANOVA de dos vías mostró diferencias para los factores tratamiento ($F(4,50) = 10.083$, $p < 0.0001$) y región ($F(1,50) = 45.586$, $p < 0.0001$), así como un efecto significativo en la interacción entre estos dos factores ($F(4,50) = 2.928$, $p < 0.03$). La prueba post hoc Bonferroni reveló que el núcleo BLa del grupo 3.0 mA tenían un mayor porcentaje de células c-Fos que el resto de los grupos ($p < 0.001$ vs. Bio; < 0.01 vs. SC-3; $p < 0.001$ vs. Contexto; $p < 0.001$ vs. 1.0 mA); y los grupos 1.0 mA y SC-3 tenían un mayor porcentaje de células c-Fos que el grupo Bio ($p < 0.05$ y < 0.01 , respectivamente). Interesantemente, al analizar el BLp, la prueba de Bonferroni mostró que no hubo diferencias significativas entre ninguno de los grupos (Figura 13. C). Al comparar entre BLa y BLp los efectos de cada uno de los tratamientos sobre la expresión de c-Fos encontramos que los grupos Bio no diferían entre sí, al igual que los grupos de Contexto. Por el contrario, los grupos SC-3, 1.0 mA, y 3.0 mA BLa mostraron un alto porcentaje en células positivas a c-Fos al compararlo con su correspondiente grupo BLp ($p < 0.05$, < 0.05 , y < 0.001 , respectivamente). Porcentaje medio de células que expresan c-Fos \pm SEM en BLa: Bio, $0.83\% \pm 0.42$; SC-3, $2.54\% \pm 0.38$; Contexto, $1.80\% \pm 0.52$; 1.0 mA, $2.18\% \pm 0.30$; y 3.0 mA, $4.51\% \pm 0.76$; y porcentaje medio de células que expresan c-Fos en BLp: Bio, $0.09\% \pm 0.03$; SC-3, $0.92\% \pm 0.18$; Contexto, $0.62\% \pm 0.34$; 1.0 mA, $0.54\% \pm 0.18$; y 3.0 mA, $1.25\% \pm 0.33$.

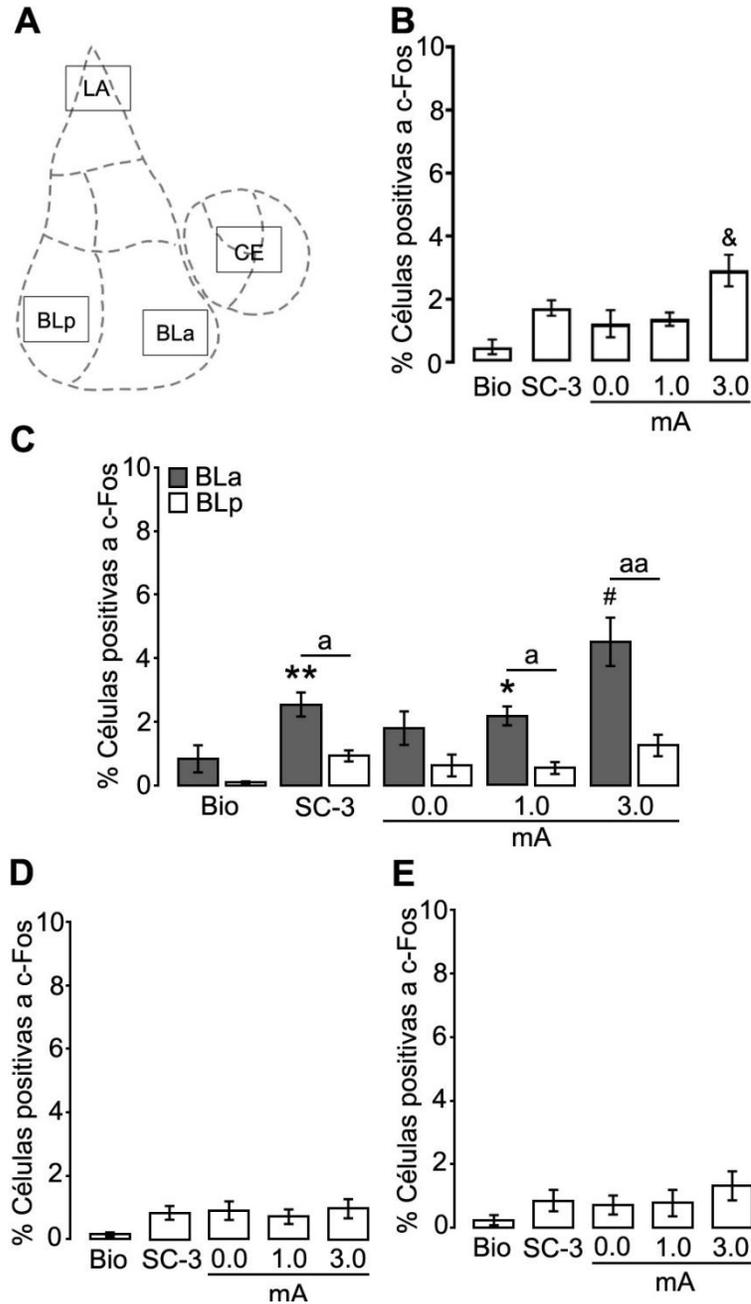


Figura 13. Después de un entrenamiento aversivo intenso y moderado un mayor número de células positivas a c-Fos es reclutada en la región basolateral anterior de la amígdala. (A) Las células que expresaron c-Fos fueron contabilizadas en el núcleo lateral (LA), el núcleo central (CE) y la porción posterior (BLp) y anterior (BLa) del núcleo basolateral de la amígdala (BL); modificado de Paxinos y Watson (2007). Promedio (\pm SEM) del porcentaje de células que expresan la proteína c-Fos en LA (D); en CE (E); en BL (B) y en BLa y BLp (C). Bio, grupo bioterio; SC-3, grupo de solo choque de 3.0 mA; 0.0, grupo contexto; 1.0 y 3.0, grupos entrenados con 1.0 y 3.0 mA, respectivamente ($n = 6$ por grupo). & $p < 0.05$ vs BL Bio, 0.0 mA, 1.0 mA; * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs BLa Bio; # $p < 0.01$ vs el resto de los grupos BLa; a $p < 0.05$ BLa vs BLp; aa $p < 0.001$ BLa vs BLp.

7. 2. 1. 2. Amígdala Lateral

El ANOVA de una vía no mostró diferencias significativas en la expresión de c-Fos entre los grupos ($F(4, 25) = 1.905$; $p = 0.141$). El promedio del porcentaje de células que expresan c-Fos fue: Bio, $0.16\% \pm 0.06$; SC-3, $0.84\% \pm 0.21$; Contexto, $0.91\% \pm 0.29$; 1.0 mA, $0.72\% \pm 0.23$; y 3.0 mA, $0.97\% \pm 0.30$ (Figura 13. D).

7. 2. 1. 3. Amígdala Central

El ANOVA de una vía no mostró diferencias significativas en la expresión de c-Fos entre los grupos ($F(4, 25) = 1.219$, $p = 0.328$). El promedio del porcentaje de células que expresan c-Fos fue: Bio, $0.24\% \pm 0.16$; SC-3, $0.85\% \pm 0.34$; Contexto, $0.71\% \pm 0.30$; 1.0 mA, $0.78\% \pm 0.42$; y 3.0 mA, $1.32\% \pm 0.46$ (Figura 13. E).

7. 2. 2. Hipocampo

7. 2. 2. 1. Giro Dentado

El ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del tratamiento en el porcentaje de células que expresan c-Fos después del entrenamiento en EI ($F(4, 28) = 2.632, p = 0.0451$). La prueba post hoc Bonferroni reveló que la región GD del grupo 1.0 mA tenían un mayor porcentaje de células c-Fos que el resto de los grupos ($p < 0.01$ vs. Bio; < 0.05 vs. SC-3; < 0.01 vs. SC-1; $p < 0.05$ vs. 3.0 mA), excepto al ser comparado con el grupo Contexto ($p = 0.10$). El promedio de porcentaje de células que expresan c-Fos: Bio, $0.189\% \pm 0.06$; SC-1, $0.23\% \pm 0.07$; SC-3, $0.283\% \pm 0.09$; Contexto, $0.34\% \pm 0.10$; 1.0 mA, $0.51\% \pm 0.06$; y 3.0 mA, $0.22\% \pm 0.05$ (Figura 15. B). La Figura 14 muestra ejemplos de microfotografías de inmunotinción de c-Fos y detección de DAPI.

7. 2. 2. 2. CA1

El ANOVA de una vía no mostró diferencias significativas en la expresión de c-Fos entre los grupos ($F(4, 23) = 1.862; p = 0.1515$). El promedio del porcentaje de células que expresan c-Fos fue: Bio, $0.04\% \pm 0.03$; SC-3, $0.02\% \pm 0.02$; Contexto, $0.08\% \pm 0.04$; 1.0 mA, $0.6\% \pm 0.38$; y 3.0 mA, $0.04\% \pm 0.02$ (Figura 15. C).

7. 2. 2. 3. CA3

El ANOVA de una vía no mostró diferencias significativas en la expresión de c-Fos entre los grupos ($F(4, 20) = 1.941; p = 0.143$). El promedio del porcentaje de células que expresan c-Fos fue: Bio, $0.17\% \pm 0.09$; SC-3, $0.07\% \pm 0.05$; Contexto, $0.40\% \pm 0.14$; 1.0 mA, $0.24\% \pm 0.08$; y 3.0 mA, $0.39\% \pm 0.13$ (Figura 15. D).

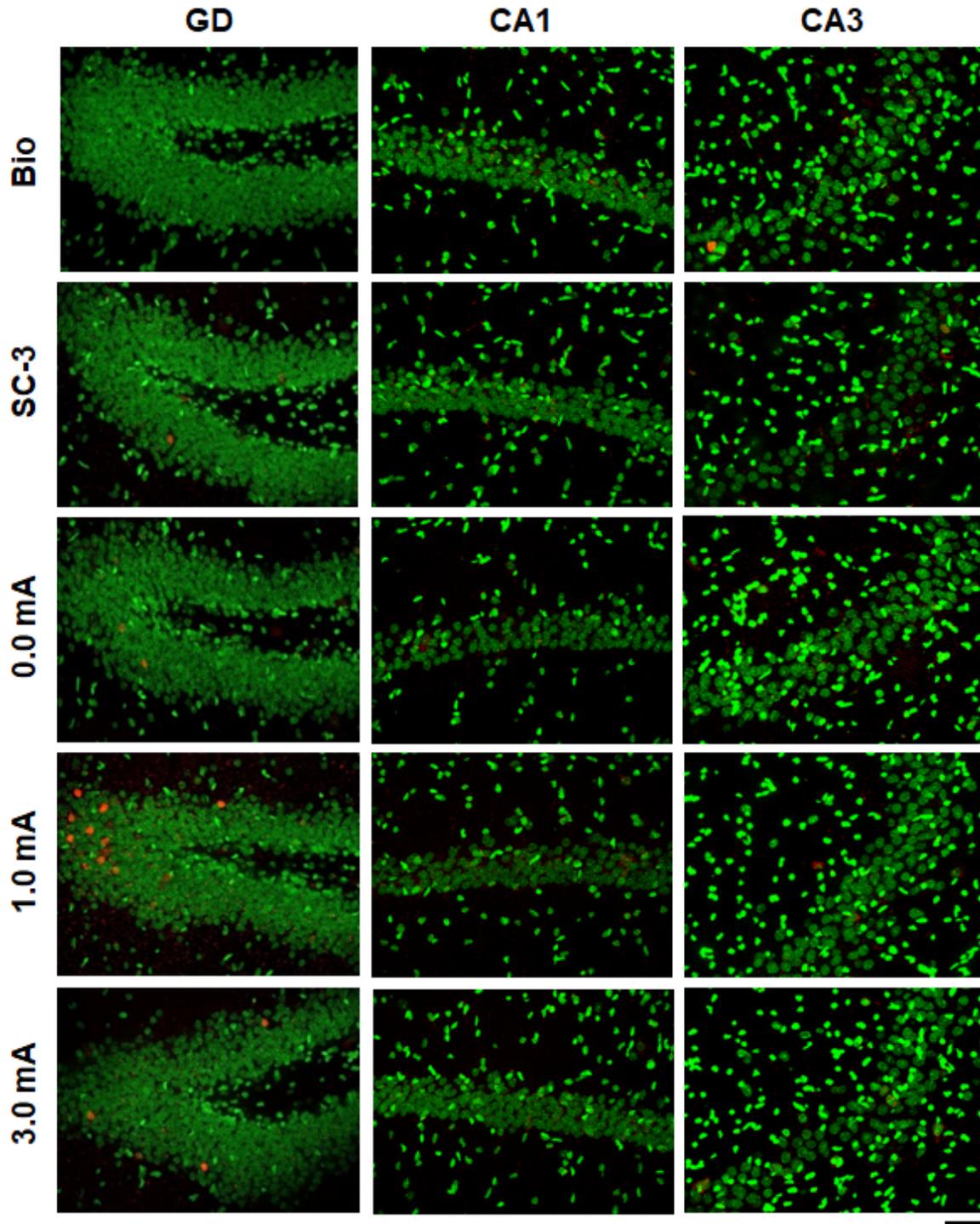


Figura 14. Imágenes representativas del GD, CA1 y CA3 del hipocampo, de cada una de las condiciones de tratamiento: Bio, Solo choque de 1.0 mA (SC-1), Solo choque de 3.0 mA (SC-3) y entrenado con 0.0 (contexto), 1.0 o 3.0 mA, que muestran la inmunotinción de c-Fos, contrateñida con DAPI para la detección de núcleos y la colocalización de c-Fos y núcleos. La inmunotinción de c-Fos y DAPI se coloreó de rojo y verde, respectivamente, independientemente del marcaje fluorescente nativo. Barra de escala = 50 μ m.

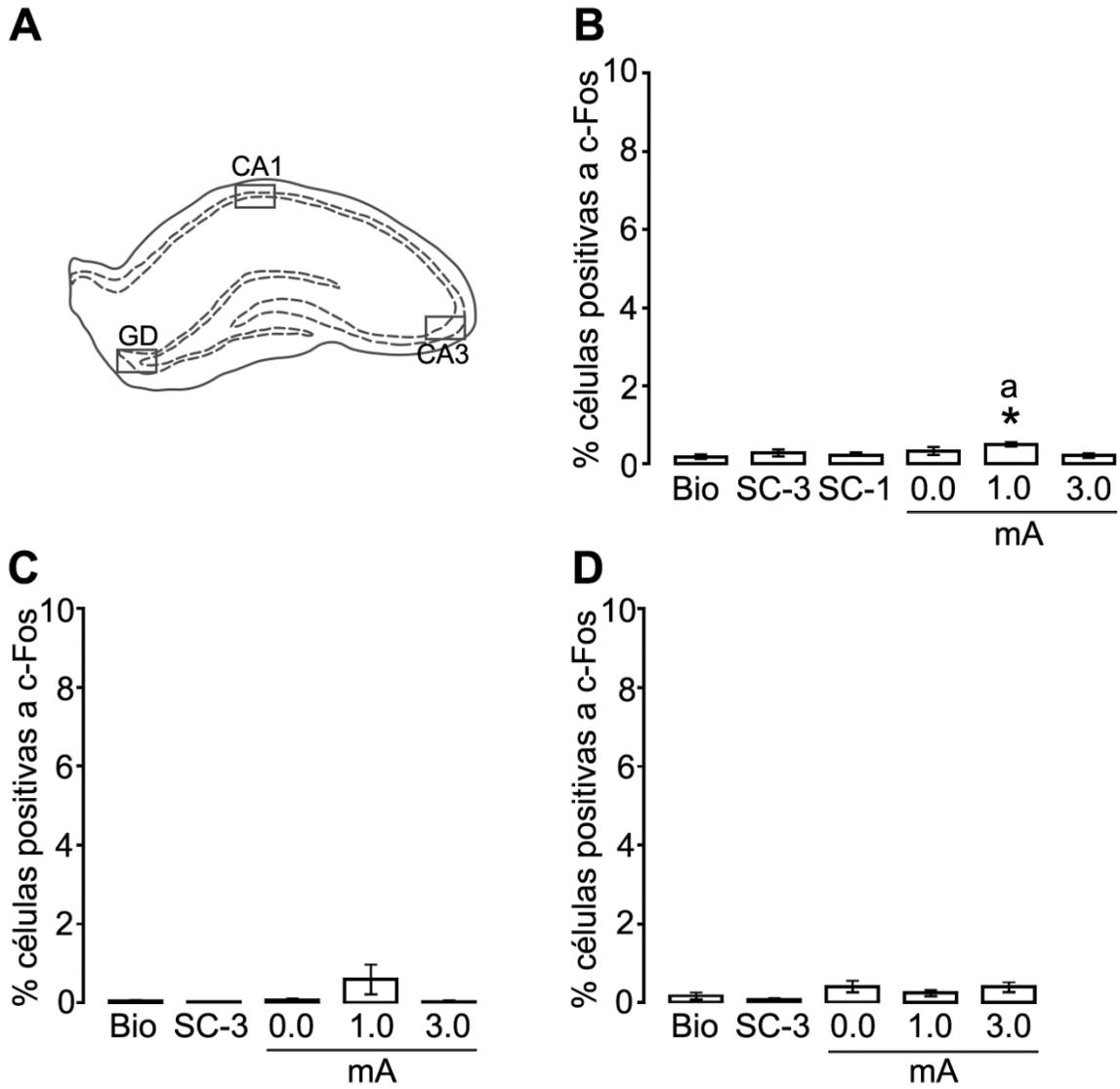


Figura 15. Después de un entrenamiento aversivo moderado un mayor número de células positivas a c-Fos es reclutada en la región del giro dentado del hipocampo. (A) Las células que expresaron c-Fos fueron contabilizadas en la porción del giro dentado (GD), CA1 y CA3 del hipocampo (modificado de Paxinos y Watson, 2007). Promedio (\pm SEM) del porcentaje de células que expresan la proteína c-Fos en GD (B); CA1 (C); y en CA3 (D). Bio, grupo bioterio; SC-1, grupo de solo choque de 1.0 mA; SC-3, grupo de solo choque de 3.0 mA; 0.0, grupo contexto; 1.0 y 3.0, grupos entrenados con 1.0 y 3.0 mA, respectivamente ($n = 5$ para los grupos SC-3 y 3.0 mA y 6 para el resto de los grupos en las regiones de GD y CA1; $n = 5$ para todos los grupos en la región CA3). * $p < 0.05$ vs Bio; a $p < 0.05$ vs el resto de los grupos excepto el grupo Contexto.

7. DISCUSIÓN

Una importante cuestión en este estudio tiene que ver con la validez del supuesto de que las intensidades de choque eléctrico, utilizadas para el entrenamiento de EI, producían efectos diferenciales en la fortaleza del aprendizaje entre condiciones de entrenamiento. Dado que la alta resistencia a la extinción es un sello distintivo de aprendizajes intensos, esperábamos y encontramos que el entrenamiento con una alta intensidad de choque eléctrico produjera una mayor resistencia a la extinción que el entrenamiento con un estímulo aversivo moderado. No se observaron signos de extinción en el grupo de 3.0 mA, ya que mostró latencias de retención óptimas en todas las sesiones de extinción que perduró hasta 15 días después del entrenamiento. Mientras que para el grupo que fue entrenado con 1.0 mA de choque eléctrico se observó una disminución progresiva en la latencia de retención a partir del cuarto a las últimas sesiones de extinción y su desempeño no fue significativamente diferente al del grupo Contexto (0.0 mA) durante estas cuatro sesiones. Estos resultados concuerdan bien con los hallazgos previos de nuestro laboratorio, donde el entrenamiento de IA con la estimulación altamente aversiva utilizada en el presente estudio también produjo una mayor resistencia a la extinción que el entrenamiento con la estimulación aversiva baja (Bello-Medina *et al.*, 2016; Garín-Aguilar *et al.*, 2012). Hallazgos similares fueron reportados también por Bekinschtein *et al.* (2010) después de un entrenamiento aversivo intenso y moderado en una tarea de EI en la versión “step-down”.

Con respecto a los resultados obtenidos a partir de los análisis histológicos en la amígdala. Los principales hallazgos en esta región fueron que el entrenamiento moderado en EI aumentó el número de células que expresan c-Fos en BLa, y que esta expresión aumentó aún más después del entrenamiento intenso. Las diferencias en el número de células que expresaron c-Fos en el BLa asociado a la intensidad del entrenamiento de EI no se habían reportado antes. En contraste, no se encontraron cambios en la expresión de c-Fos en BLp, CE y LA, independientemente de la intensidad de choque eléctrico utilizada para el entrenamiento. Estos hallazgos confirman parcialmente los de Zhang *et al.* (2011)

quienes, después del entrenamiento en EI, encontraron un incremento de la expresión de c-Fos en BL pero no en CE, como en nuestro caso, pero encontraron una mayor expresión en LA. Una posible explicación de las diferencias entre nuestros resultados y los resultados de Zhang *et al.* (2011) puede ser el uso de diferentes especies de roedores; nuestro trabajo se realizó en ratas mientras ellos estudiaron la expresión de c-Fos en ratones. En este contexto, existe evidencia que indica que la síntesis de proteínas en el cerebro de estas especies murinas sigue patrones diferentes, como se revela después de la inhibición de la síntesis de proteínas (Prado-Alcalá *et al.*, 2020).

La administración del choque eléctrico de 3.0 mA por sí solo (SC-3) produjo una mayor expresión de c-Fos únicamente en la región BLa, aunque la expresión fue significativamente menor que la producida por el entrenamiento intenso. La simple exposición al contexto de condicionamiento no produjo cambios en la expresión de c-Fos en ninguno de los núcleos explorados de la región de la amígdala. Estos hallazgos indican que BLa no solo es sensible al aprendizaje de EI, sino a las propiedades aversivas del estímulo condicionado, pero no a las señales contextuales presentes en la tarea de EI, medida con la actividad de c-Fos. Esto concuerda con la investigación que muestra un incremento de células positivas a c-Fos en el BLa, pero no en el BLp, como resultado de la administración de un choque eléctrico no contingente (Kim *et al.*, 2016).

Nuestros resultados muestran que c-Fos se expresó en BLa, pero no en BLp, CE ni LA después del entrenamiento en la tarea EI. Nosotros sugerimos que BLa se activó durante el proceso de adquisición, porque la expresión de c-fos y la traducción de c-Fos son transitorias, y las células c-Fos positivas observadas están relacionadas con la experiencia conductual que ocurrió 90 min antes de que se llevaran a cabo los procedimientos inmunohistoquímicos (Kovács, 2008). Este supuesto es congruente con los informes que indican que c-Fos se expresa en células de BL durante la adquisición después del condicionamiento del miedo pavloviano. LA y CE también participan en la consolidación y recuperación de este tipo de aprendizaje asociativo, respectivamente (Ressler y Maren, 2019). En el caso

de la tarea de EI, queda por investigar si c-Fos también se expresa en LA y CE durante la evocación de la memoria. Por lo tanto, parece que la activación de c-Fos es un buen marcador de la participación de la amígdala en el aprendizaje del condicionamiento del miedo pavloviano y de la tarea instrumental de EI.

Sin embargo, se han obtenido resultados inconsistentes con respecto a la expresión de c-Fos en la amígdala después del entrenamiento de evitación activa. Savonenko *et al.* (1999) realizaron un estudio detallado haciendo correlaciones en CE, LA, BL y otros núcleos amigdalinos, entre la expresión de c-Fos y cada una de una serie de variables dependientes relacionadas con la adquisición de una tarea de evitación activa compuesta por múltiples ensayos. Descubrieron que la activación de c-Fos no se correlaciona con la respuesta aprendida; en cambio, la inmunorreactividad de c-Fos en algunos de estos núcleos se correlacionó con el número de respuestas emitidas entre cada ensayo y las conductas de aseo; los autores sugirieron que los núcleos LA, BL y medial están involucrados principalmente en la modulación de la ansiedad (Savonenko *et al.*, 1999).

Por otro lado, cuando las ratas fueron entrenadas en la tarea de evitación activa de Sidman, en donde los animales aprenden a evitar el estímulo aversivo (choque eléctrico) cruzando a otro compartimento, lo que permitió diferenciar entre buenos y malos evitadores, se encontró que la expresión de c-Fos en LA, CE, amígdala medial, amígdala basal, y la corteza prefrontal infralímbica se correlacionó con el rendimiento de evitación (Martínez-Moreno, 2013). Posteriormente, Jiao *et al.* (2015) reportaron que, durante la adquisición de la evitación activa, en donde los animales evitan el estímulo aversivo (choque eléctrico) presionando una palanca, no hubo cambios en la expresión de c-Fos en LA y núcleos basales, pero hubo una mayor expresión en CE. Estas discrepancias podrían explicarse por las diferencias de procedimiento involucradas en estas tareas que pueden involucrar diferentes procesos fisiológicos que pueden reclutar diversos circuitos neuronales dentro de la amígdala.

Como se mencionó previamente en la introducción, una amplia evidencia experimental ha revelado que los tratamientos que fisiológicamente interfieren con la consolidación de la memoria se vuelven ineficaces en condiciones de entrenamiento intenso.

Sin embargo, a pesar de la cantidad de evidencias conductuales que muestran el efecto protector del entrenamiento intenso, es poco lo que se sabe sobre los mecanismos subyacentes. Algunas evidencias apuntan a una reorganización morfológica plástica que se produce como consecuencia de una mayor cantidad de entrenamiento. Se ha encontrado que el sobreentrenamiento en el laberinto acuático de Morris induce un aumento significativo en las terminales de fibras musgosas y en la densidad sináptica del estrato *oriens* en CA3 (Ramírez-Amaya *et al.*, 1999), así como una mayor densidad de excrescencias espinosas en las dendritas basales de las neuronas piramidales CA3 (Gómez-Padilla *et al.*, 2020). En el caso de la EI, el entrenamiento intenso provoca una espinogénesis incrementada de espinas de tipo hongo en la región dorsomedial del cuerpo estriado anterior (Bello-Medina *et al.*, 2016). Esto sugiere que estos cambios plásticos a nivel sináptico, inducidos por estos tipos de entrenamiento, son eventos importantes que participan en lo que debe ser un mecanismo complejo subyacente al efecto protector contra los tratamientos amnésicos.

Encontramos un incremento en el número de células que expresan c-Fos en la región BLa después de un entrenamiento en la tarea de EI y después de la administración de un choque eléctrico no contingente; además se produjo un incremento significativamente mayor de este tipo de células por el entrenamiento intenso.

Estos datos sugieren que la región BLa participa en la codificación tanto de la información necesaria para adquisición de un entrenamiento moderado e intenso en EI, como de las propiedades aversivas del choque eléctrico. Estos resultados son similares a los hallazgos reportados por González- Franco *et al.* (2017) quienes encontraron una relación directa entre el número de células activas y la intensidad

de entrenamiento de EI en la región ventral del estriado anterior de ratas. Como se mencionó anteriormente, un incremento en la espinogénesis fue inducida en el estriado dorsal como consecuencia de un entrenamiento intenso en EI, y también se observó que el estímulo del choque eléctrico por sí solo incrementa la espinogénesis en las regiones shell y core del núcleo acumbens (Bello-Medina *et al.*, 2016). Estos datos apuntan a una estrecha relación funcional entre estas regiones cerebrales, ya que la amígdala basolateral tiene conexiones eferentes con el cuerpo estriado dorsal y las regiones del núcleo acumbens (Heidbreder y Groenewegen, 2003; McDonald, 1991; Mulder *et al.*, 1998; Voorn *et al.*, 2004). De esta forma podemos inferir que la región BLa juega un papel importante como integrador de la información derivada de los procesos asociativos implicados en el entrenamiento de EI y de las características de la estimulación aversiva, que eventualmente activarán el cuerpo estriado y el núcleo acumbens, respectivamente. En este sentido, Pelletier *et al.* (2005) observaron actividad celular en la región BL después del entrenamiento de EI en gatos, y concluyeron que esta actividad producía plasticidad Hebbiana en estructuras diana.

Los cambios morfológicos y funcionales producidos por el entrenamiento intenso podrían ser mecanismos subyacentes a su efecto protector frente a tratamientos amnésicos. En otras palabras, una experiencia incrementada de aprendizaje conduciría a la activación de un mayor número de neuronas en áreas extensas del cerebro, y esto estaría acompañado por una mayor espinogénesis. Por lo tanto, la administración de tratamientos amnésicos en un área del cerebro sería inefectivo porque más neuronas (o estructuras) estarían involucradas en la formación de la huella de la memoria (Prado-Alcalá *et al.*, 2007).

Como se mencionó, BLa expresó células c-Fos en función de la fuerza del entrenamiento aversivo, mientras que no se evidenciaron cambios en la expresión en BLp. Un estudio realizado por Kim *et al.* (2016) puede arrojar luz sobre esta diferenciación funcional. Ellos observaron que en BLa el porcentaje de células positivas a c-Fos se vio incrementada en respuesta a estímulos negativos (por ejemplo, choque eléctrico en las patas), mientras que el incremento en el porcentaje

de células en la BLp se observó en respuesta a estímulos positivos (por ejemplo, sacarosa). Además, observaron que tanto la inhibición de BLa como la fotoactivación de BLp, en un modelo de ratones transgénicos, la respuesta de congelamiento ante la exposición de un choque eléctrico en las patas de los animales se veía reducida. Estos hallazgos sugieren que la activación de las neuronas BLa y BLp pueden mediar comportamientos opuestos quizás a través de inhibición recíproca, lo que indica que, probablemente, la activación de BLa inhibe la expresión de c-Fos en BLp.

El presente estudio mostró que BLa es activada después del entrenamiento de EI, lo que indica que está involucrada en la adquisición de esta conducta. Un número importante de investigaciones ha demostrado que la expresión de las memorias de estímulos aversivos puede persistir si hay un tiempo adecuado para que la consolidación se lleve a cabo antes de que se inactive la amígdala y también se ha reportado que la retención de un entrenamiento incrementado de EI no fue bloqueada por lesiones en la amígdala (Lehmann *et al.*, 2000; Parent *et al.*, 1992, 1995; Parent y McGaugh, 1994). Estos hallazgos sugieren que el almacenamiento de la memoria de evitación inhibitoria puede estar ubicado fuera de la amígdala. Evidencia adicional indica que la amígdala basolateral modula la consolidación de la memoria a través de eferentes a otras regiones del cerebro tales como el estriado y el hipocampo (McGaugh, 2002, 2004; Packard *et al.*, 1994; Vazdarjanova y McGaugh, 1999), regiones estudiadas en el presente trabajo.

Por otra parte, el principal hallazgo observado en el hipocampo fue el aumento significativo en el porcentaje de núcleos c-Fos positivos en el GD después de que los sujetos fueron sometidos a un entrenamiento aversivo moderado y, por el contrario, no se encontraron cambios en la expresión de c-Fos en CA1 y CA3 independientemente de la intensidad de choque eléctrico utilizada para el entrenamiento. Si bien los resultados obtenidos en el hipocampo contrastan con lo esperado, si se relacionan con resultados obtenidos en un estudio (González-Franco *et al.*, en preparación), en donde observaron un incremento en el porcentaje de células positivas a Arc únicamente en la región del GD, sin encontrar cambios

en CA1 y CA3, del grupo de sujetos entrenados con las intensidades más bajas de choque eléctrico (0.5 mA y 1.0 mA), pero no en los sujetos del grupo entrenado con la intensidad más alta de choque eléctrico (2.0 mA); así como en un estudio hecho por (Salomé *et al.*, 2004) en donde observaron un mayor número de células positivas a c-Fos en el GD del hipocampo dorsal, de sujetos con baja presencia de conductas relacionadas con ansiedad, medidas en el laberinto T elevado, comparada con grupos controles de caja, así como con un grupo que mostraba una mayor presencia de conductas relacionadas con ansiedad; por otra parte, los sujetos con expresiones mayores de conductas ansiosas, no mostraron diferencias en la expresión de c-Fos en el GD del hipocampo comparado con el grupo control. Ellos proponen que la menor expresión que se observó de la proteína c-Fos en los sujetos con una conducta de ansiedad mayor puede contribuir a esta desregulación emocional, como lo observado también en estudios clínicos en donde encuentran una hipofunción en el hipocampo de sujetos que presentan desórdenes de ansiedad (trastorno de estrés post traumático) (Bremner *et al.*, 2003). Es importante mencionar que las conductas de evitación y de escape han sido relacionadas con síntomas clásicos observados en sujetos que presentan ansiedad (Pobbe *et al.*, 2014) y que el incremento del estrés, como el que se produce durante la administración de un choque eléctrico intenso, puede inducir resistencia a la extinción, como lo observado en nuestro experimento y en sujetos que presentan estados de ansiedad (Navarro-Francés y Arenas, 2014).

Se sabe que las experiencias emocionales suelen recordarse con una viveza e intensidad particular y que pueden mantenerse en la memoria por largos periodos de tiempo (McGaugh y Roozendaal, 2002). Durante los eventos estresantes se induce la liberación de hormonas del estrés, que incluye las catecolaminas y los glucocorticoides, y se ha encontrado que, tanto en animales como en humanos, estas hormonas producen un profundo efecto sobre la cognición (Roozendaal y McGaugh, 2011) y que la activación de la amígdala es fundamental para mediar las influencias de estas hormonas del estrés, porque lesiones de la amígdala bloquean los efectos de estos moduladores sobre la consolidación (McGaugh, 2002, 2004; Packard *et al.*, 1994; Vazdarjanova y McGaugh, 1999).

La hipótesis de que la amígdala modula el almacenamiento de la memoria en el hipocampo tiene sus raíces en varias líneas de investigación a nivel anatómico, electrofisiológico y funcional. Se sabe que la región BLA influye indirectamente en la actividad y plasticidad del hipocampo dorsal (Frey *et al.*, 2001; Ikegaya *et al.*, 1996; Lovitz y Thompson, 2015; McIntyre *et al.*, 2005; McReynolds *et al.*, 2014) y se ha propuesto que esto puede ser llevado a cabo través de las proyecciones indirectas por medio de la vía corteza entorrinal o parasubicular (Krettek y Price, 1978; Pitkänen *et al.*, 2000) ya que las proyección directa con BLA solo están presentes con el hipocampo ventral (Pikkarainen *et al.*, 1999; Pitkänen *et al.*, 2000). En particular, se ha observado que la inyección de agonistas a receptores β -adrenérgicos en el complejo BLA inducen cambios moleculares como el incremento en la expresión de la proteína Arc en el hipocampo (McIntyre *et al.*, 2005). Es importante mencionar que la administración de un estímulo aversivo, como un choque eléctrico en las patas, es capaz de promover la liberación de norepinefrina en la amígdala, y el incremento es proporcional a la intensidad del estímulo eléctrico (Quirarte *et al.*, 1998). Y aunque en nuestro estudio no observamos un incremento proporcional en la expresión de c-Fos a la intensidad como lo esperado, es importante continuar explorando otros marcadores de actividad celular distintas a c-Fos y Arc, así como otros tiempos, como lo observado por un estudio hecho por Bekinschtein *et al.* (2010) en el cual un incremento significativamente mayor en la expresión de c-Fos y otras como la proteína CaMKII α y la proteína cinasa regulada por señales extracelular o ERK-2 (por sus siglas en inglés, extracellular signal-regulated kinases), involucradas en la plasticidad sináptica, comparado con el grupo control de vida, se mostró 24 horas después en sujetos que fueron entrenados a una tarea de EI.

Otra explicación posible a la ausencia de cambio en el grupo entrenado con un choque eléctrico alto puede ser explicada en parte, y bajo cierta discreción debido a que aún es necesario continuar investigando, por estudios previos. En el estudio de Packard y Gabriele (2009), entrenaron a ratas en un laberinto cruz sumergido en agua tarea. Esta tarea puede ser resulta de dos maneras y el objetivo de los animales es llegar a una plataforma elevada. En su versión denominada de

lugar, los animales tienen la posibilidad de orientarse de manera espacial a través de referencias externas en el laberinto y llegar a la plataforma, aunque estos hayan sido colocados en cualquiera de los brazos del laberinto, además se sabe que este tipo de aprendizaje es dependiente del hipocampo. Mientras que en su versión de respuesta los animales debían girar consistentemente en la misma dirección para llegar a la plataforma, siendo este tipo de aprendizaje dependiente del estriado. Después de entrenar a las ratas ellos administraron, de forma sistémica, el fármaco RS 79948, un antagonista altamente selectivo del receptor adrenérgicos α_2 , este receptor se encuentra en varias estructuras cerebrales y a nivel presináptico modula la liberación de norepinefrina, por lo que la inhibición de estos receptores a través del RS 79948 aumenta la liberación de norepinefrina en el cerebro de las ratas. Lo que ellos observaron fue que la administración de RS 79948 produjo un impedimento en el aprendizaje dependiente del hipocampo y un efecto facilitador en el aprendizaje dependiente del estriado. Sin embargo, cuando la amígdala fue inactivada, se bloqueó tanto el efecto facilitador del aprendizaje dependiente el estriado como el deterioro del aprendizaje dependiente del hipocampo producido por la administración de RS 79948.

Por su parte Kim *et al.* (2001) reportaron un efecto similar, pero en lugar de administrar una droga ansiogénica administraron un estímulo aversivo (choques eléctricos en la cola). Con relación a los efectos inducidos por la administración de un estímulo aversivo, como se mencionó con anterioridad, un choque eléctrico en las patas, se ha observado que promueve la liberación de norepinefrina en la amígdala y además dicho incremento es proporcional a la intensidad del estímulo eléctrico (Quirarte *et al.*, 1998). Por ello es posible que los cambios en la activación celular, a través de la detección del porcentaje de células c-Fos positivas, observados en el hipocampo de sujetos bajo condiciones de entrenamiento moderado e incrementado, pueda ser debido a que la amígdala se encuentre modulando la activación del hipocampo o del estriado, dependiendo de las condiciones del entrenamiento. Es decir que, bajo condiciones moderadas de choque eléctrico durante el entrenamiento, la liberación de norepinefrina en la amígdala puede ser menor, así como su activación celular, en comparación a los

sujetos entrenados con una alta intensidad, por lo que bajo esta situación la amígdala reclutará un mayor porcentaje de células en el hipocampo para poder promover la adquisición. De igual manera, la condición en la cual los sujetos son entrenados con una alta intensidad de choque es probable que el incremento de la liberación de norepinefrina sea mayor en la amígdala, así como su activación celular, resultando en el reclutamiento o activación de más células en el estriado para la adquisición de la tarea EI. En el estriado, como se ha mencionado se encontró una relación directa entre el número de células activas (positivas a Arc) y la intensidad de entrenamiento de EI en la región ventral del estriado anterior de ratas (González- Franco *et al.*, 2017).

Por otro lado, se sabe que la activación de receptores a glucocorticoides o receptores β -adrenérgicos en la BLA, modula la plasticidad sináptica específicamente en el GD del hipocampo, sin afectar a la plasticidad de CA1 (Vouimba *et al.*, 2007). Por ello se ha propuesto que otros mecanismos moleculares están involucrados en la modulación de la plasticidad sináptica de la región de CA1 del hipocampo o es probable que los eventos plásticos en esta región puedan llevarse a cabo en etapas más tardías como lo observado por Farmer y Thompson (2012), en el sentido de que un aumento de la excitabilidad dependiente del aprendizaje de EI se produce en CA1 24 horas después del entrenamiento, y esta actividad puede ser modulada por BLA. Esto podría explicar en parte la falta de cambios en las regiones de CA1 en esta tesis, y aunque CA3 ha sido poco explorado, un mecanismo similar a CA1 podría estarse llevando a cabo y es probable que los cambios plásticos en estas regiones pueden estarse llevando en etapas más tardías.

Es importante destacar que el hecho de no haber encontrar diferencias significativas en las regiones LA y CE de la amígdala, y CA1 y CA3 del hipocampo, en ninguna de las dos condiciones de entrenamiento, así como en la región de GD en el grupo entrenado con la intensidad alta de choque eléctrico, no descartan la posibilidad de que estas regiones se encuentren involucradas en la formación de la memoria de una tarea de evitación inhibitoria. Podemos decir que las condiciones

de entrenamiento estudiadas no requirieron de una activación mayor de células durante los momentos cercanos al entrenamiento, pero es probable que los cambios en la activación en estas regiones puedan ocurrir en etapas más tardías y que es importante continuar explorando otros marcadores de actividad celular distintas a c-Fos y Arc. Por otro lado, también sería interesante evaluar posibles cambios en actividad por tipo celular, neurona o glía ya que existen reportes en donde han observados que la activación quimiogénica de la señalización de los receptores acoplados a proteínas G (que conducen a cascadas de señalización que resultan en la liberación de calcio intracelular) en los astrocitos del hipocampo mejoró la memoria espacial y aumentó la conducta de congelamiento en un ensayo de condicionamiento de miedo al contexto (Adamsky et al., 2018), mientras que en la amígdala existe evidencia que indica que la actividad de los astrocitos puede reducir las conductas de miedo (Shelkar et al., 2021; Wahis et al., 2021).

8. CONCLUSIONES

Se cumplieron las predicciones de que c-Fos se expresaría en BL después del entrenamiento de EI, y que esta expresión aumentaría después del entrenamiento intenso de esta tarea. Junto con los resultados de otros estudios, está claro que en el caso del aprendizaje motivado por aversión, la producción de c-Fos en las diferentes regiones de la amígdala depende del tipo y la intensidad de la tarea de aprendizaje que se estudia. Los hallazgos del presente estudio y estudios relacionados sugieren que, en comparación con el entrenamiento moderado, el entrenamiento intenso da como resultado el reclutamiento de un mayor número de células dentro del BLA, así como un aumento de la espinogénesis en regiones blanco fuera del BLA, como el estriado y el hipocampo, lo que puede contribuir a la formación de un trazo de memoria más fuerte. Estos datos sugieren que la región BLA participa en la codificación tanto de la información necesaria para adquisición de un entrenamiento moderado e intenso en EI, como de las propiedades aversivas del choque eléctrico.

Después de un entrenamiento aversivo moderado se recluta un mayor porcentaje de células positivas a c-Fos en el GD del hipocampo.

Después de un entrenamiento aversivo intenso el porcentaje de células positivas a c-Fos en el hipocampo no cambia con respecto a los grupos controles.

9. REFERENCIAS

- Abraham, W. C. (2008). Metaplasticity: Tuning synapses and networks for plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(5), 387. <https://doi.org/10.1038/nrn2356>
- Abraham, W. C., Mason, S. E., Demmer, J., Williams, J. M., Richardson, C. L., Tate, W. P., Lawlor, P. A., y Dragunow, M. (1993). Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation. *Neuroscience*, 56(3), 717–727. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90369-Q](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90369-Q)
- Adamsky, A., Kol, A., Kreisel, T., Doron, A., Ozeri-Engelhard, N., Melcer, T., Refaeli, R., Horn, H., Regev, L., Groyzman, M., London, M., y Goshen, I. (2018). Astrocytic Activation Generates De Novo Neuronal Potentiation and Memory Enhancement. *Cell*, 174(1), 59–71.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.002>
- Adhikari, A., Lerner, T. N., Finkelstein, J., Pak, S., Jennings, J. H., Davidson, T. J., Ferenczi, E., Gunaydin, L. A., Mirzabekov, J. J., Ye, L., Kim, S. Y., Lei, A., y Deisseroth, K. (2015). Basomedial amygdala mediates top-down control of anxiety and fear. *Nature*, 527(7577), 179–185. <https://doi.org/10.1038/nature15698>
- Adolphs, R., Tranel, D., Damasio, H., y Damasio, A. (1994). Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdala. *Nature*, 372(6507), 669–672. <https://doi.org/10.1038/372669a0>
- Amano, T., Unal, C. T., y Paré, D. (2010). Synaptic correlates of fear extinction in the amygdala. *Nature Neuroscience*, 13(4), 489–494. <https://doi.org/10.1038/nn.2499>
- Amaral, D. G., Dolorfo, C., y Alvarez-Royo, P. (1991). Organization of CA1 projections to the subiculum: A PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus*, 1(4), 415–435. <https://doi.org/10.1002/hipo.450010410>
- Amaral, D. G., y Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571–591. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90424-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90424-7)
- Amir, A., Amano, T., y Pare, D. (2011). Physiological identification and infralimbic responsiveness of rat intercalated amygdala neurons. *Journal of Neurophysiology*, 105(6), 3054–3066. <https://doi.org/10.1152/jn.00136.2011>
- Andersen, P., Morris, R., y Amaral, D. (2007). *The hippocampus book* (T. Bliss y J. O'Keefe, Eds.). Oxford University Press.
- Anderson, A. K., y Phelps, E. A. (2001). Lesions of the human amygdala impair enhanced perception of emotionally salient events. *Nature*, 411(6835), 305–309. <https://doi.org/10.1038/35077083>

- Ascoli, G. A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S. A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsáki, G., Cauli, B., De Felipe, J., Fairén, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fregnac, Y., Freund, T. F., Gardner, D., Gardner, E. P., Goldberg, J. H., Helmstaedter, M., Hestrin, S., ... Yuste, R. (2008). Petilla terminology: Nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(7), 557–568. <https://doi.org/10.1038/nrn2402>
- Balleine, B. W., Killcross, A. S., y Dickinson, A. (2003). The effect of lesions of the basolateral amygdala on instrumental conditioning. *Journal of Neuroscience*, 23(2), 666–675. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-02-00666.2003>
- Basu, J., y Siegelbaum, S. A. (2015). The Corticohippocampal Circuit, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(11), a021733. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021733>
- Bekinschtein, P., Katche, C., Slipczuk, L., Gonzalez, C., Dorman, G., Cammarota, M., Izquierdo, I., y Medina, J. H. (2010). Persistence of long-term memory storage: New insights into its molecular signatures in the hippocampus and related structures. *Neurotoxicity Research*, 18(3–4), 377–385. <https://doi.org/10.1007/s12640-010-9155-5>
- Bello-Medina, P. C., Flores, G., Quirarte, G. L., McGaugh, J. L., y Prado Alcalá, R. A. (2016). Mushroom spine dynamics in medium spiny neurons of dorsal striatum associated with memory of moderate and intense training. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(42), E6516–E6525. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613680113>
- Bertaina-Anglade, V., Tramu, G., y Destrade, C. (2000). Differential learning-stage dependent patterns of c-Fos protein expression in brain regions during the acquisition and memory consolidation of an operant task in mice. *European Journal of Neuroscience*, 12(10), 3803–3812. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00258.x>
- Blanchard, D. C., y Blanchard, R. J. (1972). Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 81(2), 281–290. <https://doi.org/10.1037/h0033521>
- Bourne, J., y Harris, K. M. (2007). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Current Opinion in Neurobiology*, 17, 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.04.009>
- Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., y Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience*, 8(9), 1263–1268. <https://doi.org/10.1038/nn1525>
- Bremner, J. D., Vythilingam, M., Vermetten, E., Southwick, S. M., McGlashan, T., Staib, L. H., Soufer, R., y Charney, D. S. (2003). Neural correlates of declarative memory for emotionally valenced words in women with posttraumatic stress disorder related to early childhood sexual abuse. *Biological Psychiatry*, 53(10), 879–889. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01891-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01891-7)
- Brock Kirwan, C., Hartshorn, A., Stark, S. M., Goodrich-Hunsaker, N. J., Hopkins, R. O., y Stark, C. E. L. (2012). Pattern separation deficits following damage to the hippocampus. *Neuropsychologia*, 50(10), 2408–2414. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2012.06.011>

- Buchwalter, G., Gross, C., y Wasylyk, B. (2004). Ets ternary complex transcription factors. *Gene*, 324, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.09.028>
- Bussey, T. J., Muir, J. L., Everitt, B. J., y Robbins, T. W. (1997). Triple dissociation of anterior cingulate, posterior cingulate, and medial frontal cortices on visual discrimination tasks using a touchscreen testing procedure for the rat. *Behavioral Neuroscience*, 111(5), 920–936. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.111.5.920>
- Casanova, J. P., Madrid, C., Contreras, M., Rodríguez, M., Vasquez, M., y Torrealba, F. (2016). A role for the interoceptive insular cortex in the consolidation of learned fear. *Behavioural Brain Research*, 296, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.08.032>
- Canquiza, L. A., y Swanson, L. W. (2007). Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Research Reviews*, 56(1), 1–26. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.05.002>
- Chang, M. C., Park, J. M., Pelkey, K. A., Grabenstatter, H. L., Xu, D., Linden, D. J., Sutula, T. P., McBain, C. J., y Worley, P. F. (2010). Narp regulates homeostatic scaling of excitatory synapses on parvalbumin-expressing interneurons. *Nature Neuroscience*, 13(9), 1090–1097. <https://doi.org/10.1038/nn.2621>
- Chang, Q., y Gold, P. E. (2003). Intra-hippocampal lidocaine injections impair acquisition of a place task and facilitate acquisition of a response task in rats. *Behavioural Brain Research*, 144(1–2), 19–24. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(03\)00063-9](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(03)00063-9)
- Chavlis, S., y Poirazi, P. (2017). Pattern separation in the hippocampus through the eyes of computational modeling. *Synapse*, 71(6), 71–76. <https://doi.org/10.1002/syn.21972>
- Chen, D. Y., Bambah-Mukku, D., Pollonini, G., y Alberini, C. M. (2012). Glucocorticoid receptors recruit the CaMKII α -BDNF-CREB pathways to mediate memory consolidation. *Nature Neuroscience*, 15(12), 1707–17014. <https://doi.org/10.1038/nn.3266>
- Chiba, T. (2000). Collateral projection from the amygdalo-hippocampal transition area and CA1 to the hypothalamus and medial prefrontal cortex in the rat. *Neuroscience Research*, 38(4), 373–383. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(00\)00183-8](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(00)00183-8)
- Chiu, R., Angel, P., y Karin, M. (1989). Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell*, 59(6), 979–986. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90754-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90754-X)
- Cho, Y. T., Ernst, M., y Fudge, J. L. (2013). Cortico-amygdala-striatal circuits are organized as hierarchical subsystems through the primate amygdala. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(35), 14017–14030. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0170-13.2013>
- Choi, D. C., Evanson, N. K., Furay, A. R., Ulrich-Lai, Y. M., Ostrander, M. M., y Herman, J. P. (2008). The anteroventral bed nucleus of the stria terminalis differentially regulates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to acute and chronic stress. *Endocrinology*, 149(2), 818–826. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0883>
- Choi, D. C., Furay, A. R., Evanson, N. K., Ostrander, M. M., Ulrich-Lai, Y. M., y Herman, J. P. (2007). Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially

- regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: Implications for the integration of limbic inputs. *Journal of Neuroscience*, 27(8), 2025–2034. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4301-06.2007>
- Cobos-Zapalaín, G. G., Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavez, M., Quirarte, G. L., Roldán-Roldán, G., Díaz Del Guante, M. A., y Prado-Alcalá, R. A. (1996). High level of footshock during inhibitory avoidance training prevents amnesia induced by intranigral injection of GABA antagonists. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65(3), 202–206. <https://doi.org/10.1006/nlme.1996.0024>
- Cohen-Cory, S., Kidane, A. H., Shirkey, N. J., y Marshak, S. (2010). Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Developmental Neurobiology*, 70(5), 271–288. <https://doi.org/10.1002/dneu.20774>
- Colgin, L. L., Moser, E. I., y Moser, M. B. (2008). Understanding memory through hippocampal remapping. *Trends in Neurosciences*, 31(9), 469–477. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.06.008>
- Corbit, L. H., Leung, B. K., y Balleine, B. W. (2013). The role of the amygdala-striatal pathway in the acquisition and performance of goal-directed instrumental actions. *Journal of Neuroscience*, 33(45), 17682–17690. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3271-13.2013>
- Cordero, M. I., y Sandi, C. (1998). A role for brain glucocorticoid receptors in contextual fear conditioning: dependence upon training intensity. *Brain Research*, 786(1–2), 11–17. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)01420-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01420-0)
- Cullinan, W. E., Herman, J. P., y Watson, S. J. (1993). Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: Evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *Journal of Comparative Neurology*, 332(1), 1–20. <https://doi.org/10.1002/cne.903320102>
- Dalton, S., y Treisman, R. (1992). Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell*, 68(3), 597–612. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90194-H](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90194-H)
- Davachi, L., y DuBrow, S. (2015). How the hippocampus preserves order: The role of prediction and context. *Trends in Cognitive Sciences*, 19(2), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2014.12.004>
- Dong, H. W., Petrovich, G. D., y Swanson, L. W. (2001). Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Research Reviews*, 38(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00079-0](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00079-0)
- Dong, H. W., y Swanson, L. W. (2006). Projections from bed nuclei of the stria terminalis, anteromedial area: Cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and behavioral aspects of energy balance. *Journal of Comparative Neurology*, 494(1). <https://doi.org/10.1002/cne.20788>
- Ehrlich, I., Humeau, Y., Grenier, F., Ciochi, S., Herry, C., y Lüthi, A. (2009). Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron*, 62(6), 757–771. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.05.026>
- Eichenbaum, H. (2014). Time cells in the hippocampus: A new dimension for mapping memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(11), 732–744. <https://doi.org/10.1038/nrn3827>

- Fanselow, M. S., y Dong, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65(1), 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>
- Fanselow, M. S., y Poulos, A. M. (2005). The neuroscience of mammalian associative learning. *Annual Review of Psychology*, 56, 207–234. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.56.091103.070213>
- Farmer, G. E., y Thompson, L. T. (2012). Learning-dependent plasticity of hippocampal CA1 pyramidal neuron postburst afterhyperpolarizations and increased excitability after inhibitory avoidance learning depend upon basolateral amygdala inputs. *Hippocampus*, 22(8), 1703–1719. <https://doi.org/10.1002/hipo.22005>
- Felix-Ortiz, A. C., y Tye, K. M. (2014). Amygdala inputs to the ventral hippocampus bidirectionally modulate social behavior. *Journal of Neuroscience*, 34(2), 586–595. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4257-13.2014>
- Ferbinteanu J. (2019). Memory systems 2018 - Towards a new paradigm. *Neurobiology of learning and memory*, 157, 61–78. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.11.005>
- Filipkowski, R. K., Knapska, E., y Kaczmarek, L. (2006). c-Fos and Zif268 in learning and memory-studies on expression and function. En R. Pinaud y L. A. Tremere (Eds.), *Immediate early genes in sensory processing, cognitive performance and neurological disorders* (pp. 137–158). Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-33604-6_8
- Fleischmann, A., Hvalby, O., Jensen, V., Strekalova, T., Zacher, C., Layer, L. E., Kvello, A., Reschke, M., Spanagel, R., Sprengel, R., Wagner, E. F., y Gass, P. (2003). Cellular/molecular impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. *Journal of Neuroscience*, 23(27), 9116–9122.
- Floresco, S. B., Yang, C. R., Phillips, A. G., y Blaha, C. D. (1998). Basolateral amygdala stimulation evokes glutamate receptor-dependent dopamine efflux in the nucleus accumbens of the anaesthetized rat. *European Journal of Neuroscience*, 10(4), 1241–1251. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00133.x>
- Frankland, P. W., Bontempi, B., Talton, L. E., Kaczmarek, L., y Silva, A. J. (2004). The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science*, 304(5672). <https://doi.org/10.1126/science.1094804>
- Franza, B. R., Rauscher, F. J., Josephs, S. F., y Curran, T. (1988). The Fos complex and fos-related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. *Science*, 239(4844), 1150–1153. <https://doi.org/10.1126/science.2964084>
- Freese, J. L., y Amaral, D. G. (2005). The organization of projections from the amygdala to visual cortical areas TE and V1 in the macaque monkey. *Journal of Comparative Neurology*, 486(4), 295–317. <https://doi.org/10.1002/cne.20520>
- Frey, S., Bergado-Rosado, J., Seidenbecher, T., Pape, H.-C., y Frey, J. U. (2001). Reinforcement of early long-term potentiation (Early-LTP) in dentate gyrus by stimulation of the basolateral amygdala: Heterosynaptic induction mechanisms of late-LTP. *Here The Journal of Neuroscience*, 21(10), 3697–3703.
- Friedman, D. P., Aggleton, J. P., y Saunders, R. C. (2002). Comparison of hippocampal, amygdala, and perirhinal projections to the nucleus accumbens:

- Combined anterograde and retrograde tracing study in the macaque brain. *Journal of Comparative Neurology*, 450(4), 345–365. <https://doi.org/10.1002/cne.10336>
- Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Cintra, S., Quirarte, G. L., Aguilar-Vázquez, A., Medina, A. C., y Prado-Alcalá, R. A. (2012). Extinction procedure induces pruning of dendritic spines in CA1 hippocampal field depending on strength of training in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00012>
- Garín-Aguilar, M. E., Medina, A. C., Quirarte, G. L., Mcgaugh, J. L., y Prado-Alcalá, R. A. (2014). Intense aversive training protects memory from the amnesic effects of hippocampal inactivation. *Hippocampus*, 24(1), 102–112. <https://doi.org/10.1002/hipo.22210>
- Geva-Sagiv, M., Las, L., Yovel, Y., y Ulanovsky, N. (2015). Spatial cognition in bats and rats: From sensory acquisition to multiscale maps and navigation. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(2), 94–108. <https://doi.org/10.1038/nrn3888>
- Gill, K. M., Bernstein, I. L., y Mizumori, S. J. Y. (2007). Immediate early gene activation in hippocampus and dorsal striatum: Effects of explicit place and response training. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87(4), 583–596. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.12.011>
- Giordano, M., y Prado-Alcalá, R. A. (1986). Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen. Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24(4), 905–909. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90435-1](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90435-1)
- Gold, P. E. (2004). Coordination of multiple memory systems. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(3), 230–242. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.07.003>
- Gómez-Padilla, E., Bello-Medina, P. C., León-Jacinto, U., Orta-Salazar, E., Quirarte, G. L., Ramírez-Amaya, V., Prado-Alcalá, R. A., y Díaz-Cintra, S. (2020). Morris water maze overtraining increases the density of thorny excrescences in the basal dendrites of CA3 pyramidal neurons. *Behavioural Brain Research*, 3(379), 112373. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112373>
- González-Franco, D. A., Ramírez-Amaya, V., Joseph-Bravo, P., Prado-Alcalá, R. A., y Quirarte, G. L. (2017). Differential Arc protein expression in dorsal and ventral striatum after moderate and intense inhibitory avoidance training. *Neurobiology of Learning and Memory*, 140, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.02.001>
- Gonzalez, M. C., Kramar, C. P., Tomaiuolo, M., Katche, C., Weisstaub, N., Cammarota, M., y Medina, J. H. (2014). Medial prefrontal cortex dopamine controls the persistent storage of aversive memories. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 408. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00408>
- González-Franco, D. A., Bello-Medina, P. C., Serafín, N., Prado-Alcalá, R. A., y Quirarte, G. L. (2019). Effects of anisomycin infusions into the dorsal striatum on memory consolidation of intense training and neurotransmitter activity. *Brain Research Bulletin*, 150, 250–260. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.06.005>
- González-Franco, D. A., Pegueros-Maldonado, R., Cruz-Quiroz, A. M., Serafín, N., Bello-Medina, P. C., Prado-Alcalá, R. A., y Quirarte, G. L. (2023). Intense

- inhibitory avoidance training increases nuclear-phosphorylated glucocorticoid receptors in neurons of CA1 of hippocampus and ventral caudate putamen. *Brain Research*, 1808, 148316. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2023.148316>
- Goosens, K. A. (2011). Hippocampal regulation of aversive memories. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(3), 460–466. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.04.003>
- Greenberg, M. E., y Ziff, E. B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature*, 311(5985), 433–438. <https://doi.org/10.1038/311433a0>
- Greenberg, M. E., Ziff, E. B., y Greene, L. A. (1986). Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science*, 234(4772), 80–83. <https://doi.org/10.1126/science.3749894>
- Groenewegen, H. J., y Russchen, F. T. (1984). Organization of the efferent projections of the nucleus accumbens to pallidal, hypothalamic, and mesencephalic structures: A tracing and immunohistochemical study in the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 223(3), 485–511. <https://doi.org/10.1002/cne.902230303>
- Groenewegen, H. J., Wrigth, C. I., y Beijer, A. V. J. (1996). The nucleus accumbens: Gateway for limbic structures to reach the motor system? *Progress in Brain Research*, 107, 347–367. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)61883-x](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)61883-x)
- Guru, A., Post, R. J., Ho, Y. Y., y Warden, M. R. (2015). Making sense of optogenetics. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(11), pyv079. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv079>
- Guzowski, J. F. (2002). Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus*, 12(1), 86–104. <https://doi.org/10.1002/hipo.10010>
- Guzowski, J. F., McNaughton, B. L., Barnes, C. A., y Worley, P. F. (1999). Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nature Neuroscience*, 2(12). <https://doi.org/10.1038/16046>
- Guzowski, J. F., Setlow, B., Wagner, E. K., y McGaugh, J. L. (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: A comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *Journal of Neuroscience*, 21(14), 5089–5098. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-14-05089.2001>
- Halazonetis, T. D., Georgopoulos, K., Greenberg, M. E., y Leder, P. (1988). c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell*, 55(5), 917–924. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90147-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90147-X)
- Han, J., Mark, M. D., Li, X., Xie, M., Waka, S., Rettig, J., y Herlitze, S. (2006). RGS2 determines short-term synaptic plasticity in hippocampal neurons by regulating Gi/o-mediated inhibition of presynaptic Ca²⁺ channels. *Neuron*, 51(5), 575–586. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.07.012>
- Harker, K. T., y Whishaw, I. Q. (2004). Impaired place navigation in place and matching-to-place swimming pool tasks follows both retrosplenial cortex lesions and cingulum bundle lesions in rats. *Hippocampus*, 14(2), 224–231. <https://doi.org/10.1002/hipo.10159>

- He, J., Yamada, K., y Nabeshima, T. (2002). A Role of Fos expression in the CA3 region of the hippocampus in spatial memory formation in rats. *Neuropsychopharmacology*, 26(2), 259–268. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00332-3](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00332-3)
- Heidbreder, C. A., y Groenewegen, H. J. (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: Evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(6), 555–579. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.09.003>
- Herman, J. P., Ostrander, M. M., Mueller, N. K., y Figueiredo, H. (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary- adrenocortical axis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29(8), 1201–1213. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.08.006>
- Hikosaka, O., y Wurtz, R. H. (1983). Visual and oculomotor functions of monkey substantia nigra pars reticulata. IV. Relation of substantia nigra to superior colliculus. *Journal of Neurophysiology*, 49(5), 1285–1301. <https://doi.org/10.1152/jn.1983.49.5.1285>
- Holland, P. C., y Gallagher, M. (2003). Double dissociation of the effects of lesions of basolateral and central amygdala on conditioned stimulus-potentiated feeding and Pavlovian-instrumental transfer. *European Journal of Neuroscience*, 17(8), 1680–1694. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02585.x>
- Hoover, W. B., y Vertes, R. P. (2007). Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Structure and Function*, 212(2), 149–179. <https://doi.org/10.1007/s00429-007-0150-4>
- Hopkins, D. A., y Holstege, G. (1978). Amygdaloid projections to the mesencephalon, pons and medulla oblongata in the cat. *Experimental Brain Research*, 32(4), 529–547. <https://doi.org/10.1007/BF00239551>
- Houser, C. R. (2007). Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. *Progress in Brain Research*, 163, 217–232. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63013-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63013-1)
- Howland, J. G., Taepavarapruk, P., y Phillips, A. G. (2002). Glutamate receptor-dependent modulation of dopamine efflux in the nucleus accumbens by basolateral, but not central, nucleus of the amygdala in rats. *Journal of Neuroscience*, 22(3). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-03-01137.2002>
- Hughes, P., Lawlor, P., y Dragunow, M. (1992). Basal expression of Fos, Fos-related, Jun, and Krox 24 proteins in rat hippocampus. *Molecular Brain Research*, 13(4), 355–357. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(92\)90219-2](https://doi.org/10.1016/0169-328X(92)90219-2)
- Hyman, S. E., Comb, M., Lin, Y. S., Pearlberg, J., Green, M. R., y Goodman, H. M. (1988). A common trans-acting factor is involved in transcriptional regulation of neurotransmitter genes by cyclic AMP. *Molecular and Cellular Biology*, 8(10), 4225–4233. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.10.4225-4233.1988>
- Ikegaya, Y., Saito, H., y Abe, K. (1996). Dentate gyrus field potentials evoked by stimulation of the basolateral amygdaloid nucleus in anesthetized rats. *Brain Research*, 718(1–2), 53–60. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01465-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01465-9)
- Inglis, F. M., y Moghaddam, B. (1999). Dopaminergic innervation of the amygdala is highly responsive to stress. *Journal of Neurochemistry*, 72(3), 1088–1094. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0721088.x>

- Inoue, T., Tsuchiya, K., y Koyama, T. (1994). Regional changes in dopamine and serotonin activation with various intensity of physical and psychological stress in the rat brain. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 49(4), 911–920. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90243-7](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90243-7)
- Ishizuka, N. (2001). Laminar organization of the pyramidal cell layer of the subiculum in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 435(1), 89–110. <https://doi.org/10.1002/cne.1195>
- James, W. (1890). *The principles of psychology* (H. Holt y Company, Ed.).
- Janak, P. H., y Tye, K. M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*, 517(7534), 284–292. <https://doi.org/10.1038/nature14188>
- Jarvis, E. D., Güntürkün, O., Bruce, L., Csillag, A., Karten, H., Kuenzel, W., Medina, L., Paxinos, G., Perkel, D. J., Shimizu, T., Striedter, G., Wild, J. M., Ball, G. F., Dugas-Ford, J., Durand, S. E., Hough, G. E., Husband, S., Kubikova, L., Lee, D. W., ... Butler, A. B. (2005). Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(2), 151–159. <https://doi.org/10.1038/nrn1606>
- Jay, T. M., y Witter, M. P. (1991). Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *Journal of Comparative Neurology*, 313(4), 574–586. <https://doi.org/10.1002/cne.903130404>
- Jeffery, K. J. (2007). Integration of the sensory inputs to place cells: What, where, why, and how? *Hippocampus*, 17(9). <https://doi.org/10.1002/hipo.20322>
- Jeffery, K. J., Abraham, W. C., Dragunow, M., y Mason, S. E. (1990). Induction of Fos-like immunoreactivity and the maintenance of long-term potentiation in the dentate gyrus of unanesthetized rats. *Molecular Brain Research*, 8(4). [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(90\)90039-G](https://doi.org/10.1016/0169-328X(90)90039-G)
- Jiao, X., Beck, K. D., Myers, C. E., Servatius, R. J., y Pang, K. C. H. (2015). Altered activity of the medial prefrontal cortex and amygdale during acquisition and extinction of an active avoidance task. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9, 249. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00249>
- Jolkkonen, E., Miettinen, R., Pikkarainen, M., y Pitkänen, A. (2002). Projections from the amygdaloid complex to the magnocellular cholinergic basal forebrain in rat. *Neuroscience*, 111(1), 133–149. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00578-4](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00578-4)
- Jones, M. W., y Wilson, M. A. (2005). Theta rhythms coordinate hippocampal–prefrontal interactions in a spatial memory task. *PLoS Biology*, 3(12), e402. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030402>
- Jung, M. W., Wiener, S. I., y McNaughton, B. L. (1994). Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *Journal of Neuroscience*, 14(12), 7347–7356. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-12-07347.1994>
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. *Science*, 294(5544), 1030–1038. <https://doi.org/10.1126/science.1067020>
- Kandel, E. R., Dudai, Y., y Mayford, M. R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell*, 157(1), 163–186. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.001>

- Kesner, R. P., Bolland, B. L., y Dakis, M. (1993). Memory for spatial locations, motor responses, and objects: Triple dissociation among the hippocampus, caudate nucleus, and extrastriate visual cortex. *Experimental Brain Research*, 93(3), 462–470. <https://doi.org/10.1007/BF00229361>
- Kim, E. J., Kim, E. S., Park, M., Cho, J., y Kim, J. J. (2012). Amygdalar stimulation produces alterations on firing properties of hippocampal place cells. *Journal of Neuroscience*, 32(33), 11424–11434. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1108-12.2012>
- Kim, J. J., Lee, H. J., Han, J.-S., y Packard, M. G. (2001). Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning. *The Journal of Neuroscience*, 21(14), 5222–5228. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-14-05222.2001>
- Kim, J., Pignatelli, M., Xu, S., Itohara, S., y Tonegawa, S. (2016). Antagonistic negative and positive neurons of the basolateral amygdala. *Nature Neuroscience*, 19(12), 1636–1646. <https://doi.org/10.1038/nn.4414>
- Kim, S. Y., Adhikari, A., Lee, S. Y., Marshel, J. H., Kim, C. K., Mallory, C. S., Lo, M., Pak, S., Mattis, J., Lim, B. K., Malenka, R. C., Warden, M. R., Neve, R., Tye, K. M., y Deisseroth, K. (2013). Diverging neural pathways assemble a behavioural state from separable features in anxiety. *Nature*, 496(7444), 219–223. <https://doi.org/10.1038/nature12018>
- Kishi, T., Tsumori, T., Ono, K., Yokota, S., Ishino, H., y Yasui, Y. (2000). Topographical organization of projections from the subiculum to the hypothalamus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 419(2), 205–222. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(20000403\)419:2<205::AID-CNE5>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(20000403)419:2<205::AID-CNE5>3.0.CO;2-0)
- Kishi, T., Tsumori, T., Yokota, S., y Yasui, Y. (2006). Topographical projection from the hippocampal formation to the amygdala: A combined anterograde and retrograde tracing study in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 496(3), 349–368. <https://doi.org/10.1002/cne.20919>
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 25(23), R1116–R1121. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>
- Kobayashi, Y., y Amaral, D. G. (2007). Macaque monkey retrosplenial cortex: III. Cortical efferents. *Journal of Comparative Neurology*, 502(5), R1116–R1121. <https://doi.org/10.1002/cne.21346>
- Kocsis, B., y Vertes, R. P. (1997). Phase relations of rhythmic neuronal firing in the supramammillary nucleus and mammillary body to the hippocampal theta activity in urethane anesthetized rats. *Hippocampus*, 7(2), 204–598. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1997\)7:2<204::AID-HIPO7>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1997)7:2<204::AID-HIPO7>3.0.CO;2-M)
- Korb, E., y Finkbeiner, S. (2011). Arc in synaptic plasticity: From gene to behavior. *Trends in Neurosciences*, 34(11), 591–598. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.08.007>
- Kouzarides, T., y Ziff, E. (1988). The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature*, 336(6200), 646–651. <https://doi.org/10.1038/336646a0>
- Kovács, K. J. (2008). Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6), 665–672. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01734.x>

- Kraus, B. J., Robinson, R. J., White, J. A., Eichenbaum, H., y Hasselmo, M. E. (2013). Hippocampal “time cells”: Time versus path integration. *Neuron*, 78(6), 1090–1101. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.04.015>
- Krettek, J. E., y Price, J. L. (1977). Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat. *The Journal of comparative neurology*, 172(4), 687–722. <https://doi.org/10.1002/cne.901720408>
- Krettek, J. E., y Price, J. L. (1978). Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *Journal of Comparative Neurology*, 178(2), 225–254. <https://doi.org/10.1002/cne.901780204>
- LaLumiere, R. T., Nawar, E. M., y McGaugh, J. L. (2005). Modulation of memory consolidation by the basolateral amygdala or nucleus accumbens shell requires concurrent dopamine receptor activation in both brain regions. *Learning and Memory*, 12(3), 296–301. <https://doi.org/10.1101/lm.93205>
- Lanahan, A., y Worley, P. (1998). Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiology of Learning and Memory*, 70(1–2), 37–43. <https://doi.org/10.1006/nlme.1998.3836>
- Lavenex, P. B., Amaral, D. G., y Lavenex, P. (2006). Hippocampal lesion prevents spatial relational learning in adult macaque monkeys. *Journal of Neuroscience*, 26(17), 4546–4558. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5412-05.2006>
- Lavenex, P., Lavenex, P. B., y Amaral, D. G. (2007). Spatial relational learning persists following neonatal hippocampal lesions in macaque monkeys. *Nature Neuroscience*, 10(2), 234–239. <https://doi.org/10.1038/nn1820>
- LeDoux, J. E., Cicchetti, P., Xagoraris, A., y Romanski, L. M. (1990). The lateral amygdaloid nucleus: Sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, 10(4), 1062–1069. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.10-04-01062.1990>
- Lehmann, H., Treit, D., y Parent, M. B. (2000). Amygdala lesions do not impair shock-probe avoidance retention performance. *Behavioral Neuroscience*, 114(1), 107–116. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.114.1.107>
- Leslie, J. H., y Nedivi, E. (2011). Activity-regulated genes as mediators of neural circuit plasticity. *Progress in Neurobiology*, 94(3), 223–237. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.05.002>
- Leuner, B., Falduto, J., y Shors, T. J. (2003). Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(2), 659–665. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-02-00659.2003>
- Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M. B., y Moser, E. I. (2007). Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science*, 315(5814). <https://doi.org/10.1126/science.1135801>
- Liang, K.-C., Yen, C.-T., Chang, C.-H., y Chen, C.-C. (2008). Involvement of the amygdala in two different forms of the inhibitory avoidance task. En M. Onozuka y CT. Yen (Eds.), *Novel Trends in Brain Science* (pp. 167–182). Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-73242-6_10
- Lisman, J., Buzsáki, G., Eichenbaum, H., Nadel, L., Rangananth, C., y Redish, A. D. (2017). Viewpoints: How the hippocampus contributes to memory, navigation

- and cognition. *Nature Neuroscience*, 20(11), 1434–1447. <https://doi.org/10.1038/nn.4661>
- Lovitz, E. S., y Thompson, L. T. (2015). Memory-enhancing intra-basolateral amygdala clenbuterol infusion reduces post-burst afterhyperpolarizations in hippocampal CA1 pyramidal neurons following inhibitory avoidance learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 119, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.12.004>
- Liu, X., Ramirez, S., Pang, P. T., Puryear, C. B., Govindarajan, A., Deisseroth, K., y Tonegawa, S. (2012). Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature*, 484(7394), 381–385. <https://doi.org/10.1038/nature11028>
- MacDonald, C. J., Carrow, S., Place, R., y Eichenbaum, H. (2013). Distinct hippocampal time cell sequences represent odor memories in immobilized rats. *Journal of Neuroscience*, 33(36), 14607–14616. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1537-13.2013>
- MacDonald, C. J., Lepage, K. Q., Eden, U. T., y Eichenbaum, H. (2011). Hippocampal “time cells” bridge the gap in memory for discontinuous events. *Neuron*, 71(4), 737–749. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.012>
- Maguire, E. A., Nannery, R., y Spiers, H. J. (2006). Navigation around London by a taxi driver with bilateral hippocampal lesions. *Brain*, 129(11), 2894–2907. <https://doi.org/10.1093/brain/awl286>
- Maguire, E. A., Woollett, K., y Spiers, H. J. (2006). London taxi drivers and bus drivers: A structural MRI and neuropsychological analysis. *Hippocampus*, 16(12), 1091–1101. <https://doi.org/10.1002/hipo.20233>
- Maren, S., y Holt, W. G. (2004). Hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats: Muscimol infusions into the ventral, but not dorsal, hippocampus impair the acquisition of conditional freezing to an auditory conditional stimulus. *Behavioral Neuroscience*, 118(1). <https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.1.97>
- Marowsky, A., Yanagawa, Y., Obata, K., y Vogt, K. E. (2005). A specialized subclass of interneurons mediates dopaminergic facilitation of amygdala function. *Neuron*, 48(6), 1025–1037. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.10.029>
- Marshall, P., y Bredy, T. W. (2016). Cognitive neuroepigenetics: The next evolution in our understanding of the molecular mechanisms underlying learning and memory? *npj Science of Learning*, 1(1), 16014. <https://doi.org/10.1038/npjscilearn.2016.14>
- Martinez, R. C. R., Gupta, N., Lazaro-Munoz, G., Sears, R. M., Kim, S., Moscarello, J. M., LeDoux, J. E., y Cain, C. K. (2013). Active vs. reactive threat responding is associated with differential c-Fos expression in specific regions of amygdala and prefrontal cortex. *Learning and Memory*, 20(8), 446–452. <https://doi.org/10.1101/lm.031047.113>
- Martínez-García, F., Martínez-Marcos, A., y Lanuza, E. (2002). The pallial amygdala of amniote vertebrates: evolution of the concept, evolution of the structure. *Brain Research Bulletin*, 57(3–4), 463–469. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00665-7](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00665-7)
- Martínez-Moreno, A. (2013). *Efecto de la inhibición de la transcripción en la amígdala sobre la consolidación de la memoria de un entrenamiento*

- incrementado* [Tesis de Maestría en Ciencias]. Instituto de Neurobiología, UNAM.
- Mau, W., Sullivan, D. W., Kinsky, N. R., Hasselmo, M. E., Howard, M. W., y Eichenbaum, H. (2018). The same hippocampal CA1 population simultaneously codes temporal information over multiple timescales. *Current Biology*, 28(10), 1499-1508.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.051>
- McDonald, A. J. (1991). Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. *Neuroscience*, 44(1), 15–33. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90248-M](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90248-M)
- McDonald, A. J. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress in Neurobiology*, 55(3), 257–332. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00003-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00003-3)
- McDonald, A. J. (2020). Functional neuroanatomy of the basolateral amygdala: Neurons, neurotransmitters, and circuits. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 26, 1–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815134-1.00001-5>
- McDonald, R. J., Devan, B. D., y Hong, N. S. (2004). Multiple memory systems: The power of interactions. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(3), 333–346. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.05.009>
- McDonald, R. J., y White, N. M. (2013). A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behavioral Neuroscience*, 127(6), 835–853. <https://doi.org/10.1037/a0034883>
- McGaugh, J. L. (2002). Memory consolidation and the amygdala: A systems perspective. *Trends in Neurosciences*, 25(9), 456. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02211-7](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02211-7)
- McGaugh, J. L. (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 1–28. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144157>
- McGaugh, J. L., McIntyre, C. K., y Power, A. E. (2002). Amygdala modulation of memory consolidation: Interaction with other brain systems. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(3), 539–552. <https://doi.org/10.1006/nlme.2002.4082>
- McGaugh, J. L., y Roozendaal, B. (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Current opinion in neurobiology*, 12(2), 205–210.
- McIntyre, C. K., Miyashita, T., Setlow, B., Marjon, K. D., Steward, O., Guzowski, J. F., y McGaugh, J. L. (2005). Memory-influencing intra-basolateral amygdala drug infusions modulate expression of Arc protein in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30), 10718–10723. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504436102>
- McReynolds, J. R., Anderson, K. M., Donowho, K. M., y McIntyre, C. K. (2014). Noradrenergic actions in the basolateral complex of the amygdala modulate Arc expression in hippocampal synapses and consolidation of aversive and non-aversive memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 115, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.08.016>
- Medina, A. C., Torres-García, M. E., Rodríguez-Serrano, L. M., Bello-Medina, P. C., Quirarte, G. L., McGaugh, J. L., y Prado-Alcalá, R. A. (2019). Inhibition of transcription and translation in dorsal hippocampus does not interfere with consolidation of memory of intense training. *Neurobiology of Learning and Memory*, 166, 107092. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.107092>

- Miyashita, T., Kikuchi, E., Horiuchi, J., y Saitoe, M. (2018). Long-term memory engram cells are established by c-Fos/CREB transcriptional cycling. *Cell Reports*, 25(10), 2716-2728.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.022>
- Modi, M. N., Dhawale, A. K., y Bhalla, U. S. (2014). CA1 cell activity sequences emerge after reorganization of network correlation structure during associative learning. *eLife*, 3, e01982. <https://doi.org/10.7554/eLife.01982>
- Mogenson, G. J., Swanson, L. W., y Wu, M. (1983). Neural projections from nucleus accumbens to globus pallidus, substantia innominata, and lateral preoptic-lateral hypothalamic area: An anatomical and electrophysiological investigation in the rat. *Journal of Neuroscience*, 3(1), 189–202. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.03-01-00189.1983>
- Montminy, M. R., y Bilezikjian, L. M. (1988). Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature*, 328(6126), 175–178. <https://doi.org/10.1038/328175a0>
- Morgan, J. I., Cohen, D. R., Hempstead, J. L., y Curran, T. (1987). Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science (New York, N. Y.)*, 237(4811), 192–197.
- Morgan, J. I., y Curran, T. (1986). Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature*, 322(6079), 552–555. <https://doi.org/10.1038/322552a0>
- Morgan, R. J., Santhakumar, V., y Soltesz, I. (2007). Modeling the dentate gyrus. *Progress in Brain Research*, 163, 639–658. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63035-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63035-0)
- Mulder, A. B., Hodenpijl, M. G., y Lopes da Silva, F. H. (1998). Electrophysiology of the hippocampal and amygdaloid projections to the nucleus accumbens of the rat: Convergence, segregation, and interaction of inputs. *Journal of Neuroscience*, 18(13), 5095–5102. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-13-05095.1998>
- Muller, R. U., Stead, M., y Pach, J. (1996). The hippocampus as a cognitive graph. *The Journal of General Physiology*, 107(6), 663–694. <https://doi.org/10.1085/jgp.107.6.663>
- Muñoz Sánchez, S. (2012). *Efectos de la inhibición de la síntesis de proteínas en la corteza insular sobre la consolidación de un aprendizaje incrementado en la tarea de evitación inhibitoria* [Tesis de Maestría en Ciencias]. Instituto de Neurobiología, UNAM.
- Naber, P. A., y Witter, M. P. (1998). Subicular efferents are organized mostly as parallel projections: A double-labeling, retrograde-tracing study in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 393(3), 284–297. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980413\)393:3<284::AID-CNE2>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980413)393:3<284::AID-CNE2>3.0.CO;2-Y)
- National Research Council. (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals* (8th ed). National Academy of Sciences. <https://doi.org/10.17226/12910>
- Navarro-Francés, C. I., y Arenas, M. C. (2014). Influence of trait anxiety on the effects of acute stress on learning and retention of the passive avoidance task in male and female mice. *Behavioural Processes*, 105, 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2014.02.009>
- Norman, C., Runswick, M., Pollock, R., y Treisman, R. (1988). Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the

- c-fos serum response element. *Cell*, 55(6), 989–1003. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90244-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90244-9)
- O'Donnel, C., Nolan, M. F., y van Rossum, M. C. W. (2011). Dendritic spine dynamics regulate the long-term stability of synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience*, 31(45), 16142–16156. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2520-11.2011>
- Ögren, S. O., y Stiedl, O. (2013). Passive avoidance. En *Encyclopedia of Psychopharmacology* (pp. 1–10). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27772-6_160-2
- Oliveira-dos-Santos, A. J., Matsumoto, G., Snow, B. E., Bai, D., Houston, F. P., Whishaw, I. Q., Mariathasan, S., Sasaki, T., Wakeham, A., Ohashi, P. S., Roder, J. C., Barnes, C. A., Siderovski, D. P., y Penninger, J. M. (2000). Regulation of T cell activation, anxiety, and male aggression by RGS2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(22), 12272–12277. <https://doi.org/10.1073/pnas.220414397>
- Orsini, C. A., y Maren, S. (2012). Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(7), 1773–1802. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.12.014>
- Packard, M. G., Cahill, L., y McGaugh, J. L. (1994). Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(18), 8477–8481.
- Packard, M. G., y Gabriele, A. (2009). Peripheral anxiogenic drug injections differentially affect cognitive and habit memory: role of basolateral amygdala. *Neuroscience*, 164(2), 457–462. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.07.054>
- Packard, M. G., y Knowlton, B. J. (2002). Learning and memory functions of the basal ganglia. *Annual Review of Neuroscience*, 25, 563–593. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142937>
- Pape, H. C., y Pare, D. (2010). Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiological Reviews*, 90(2), 419–463. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2009>
- Parent, M. B., y McGaugh, J. L. (1994). Posttraining infusion of lidocaine into the amygdala basolateral complex impairs retention of inhibitory avoidance training. *Brain Research*, 661(1–2), 97–103. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91186-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91186-X)
- Parent, M. B., Quirarte, G. L., Cahill, L., y McGaugh, J. L. (1995). Spared retention of inhibitory avoidance learning after posttraining amygdala lesions. *Behavioral Neuroscience*, 109(4), 803–807. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.109.4.803>
- Parent, M. B., Tomaz, C., y McGaugh, J. L. (1992). Increased training in an aversively motivated task attenuates the memory-impairing effects of posttraining N-Methyl-D-Aspartate-induced amygdala lesions. *Behavioral Neuroscience*, 106(5), 789–797. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.106.5.789>
- Parvizi, J., Van Hoesen, G. W., Buckwalter, J., y Damasio, A. (2006). Neural connections of the posteromedial cortex in the macaque. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5), 1563–1568. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507729103>

- Pastalkova, E., Itskov, V., Amarasingham, A., y Buzsáki, G. (2008). Internally generated cell assembly sequences in the rat hippocampus. *Science*, 321(5894), 1322–1327. <https://doi.org/10.1126/science.1159775>
- Paxinos, G., y Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates (6th ed)* (Academic Press, Ed.).
- Pelletier, J. G., Likhtik, E., Filali, M., y Paré, D. (2005). Lasting increases in basolateral amygdala activity after emotional arousal: Implications for facilitated consolidation of emotional memories. *Learning and Memory*, 12(2), 96–102. <https://doi.org/10.1101/lm.88605>
- Pérez-Ruiz, C., y Prado-Alcalá, R. A. (1989). Retrograde amnesia induced by lidocaine injection into the striatum: Protective effect of the negative reinforcer. *Brain Research Bulletin*, 22, 599–603.
- Petrovich, G. D., Canteras, N. S., y Swanson, L. W. (2001). Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Research Reviews*, 38(1–2), 247–289. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00080-7](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00080-7)
- Petrovich, G. D., Risold, P. Y., y Swanson, L. W. (1996). Organization of projections from the basomedial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 374(3), 387–420. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961021\)374:3<387::AID-CNE6>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961021)374:3<387::AID-CNE6>3.0.CO;2-Y)
- Phillipson, O. T., y Griffiths, A. C. (1985). The topographic order of inputs to nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience*, 16(2), 275–296. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(85\)90002-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(85)90002-8)
- Pikkarainen, M., Rönkkö, S., Savander, V., Insausti, R., y Pitkänen, A. (1999). Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *Journal of Comparative Neurology*, 403(2), 229–260. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990111\)403:2<229::AID-CNE7>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990111)403:2<229::AID-CNE7>3.0.CO;2-P)
- Pitkänen, A., Pikkarainen, M., Nurminen, N., y Ylinen, A. (2000). Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 911, 369–391.
- Pitkänen, A., Stefanacci, L., Farb, C. R., Go, G. -Genevieve, Ledoux, J. E., y Amaral, D. G. (1995). Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: Projections originating in the lateral nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, 356(2). <https://doi.org/10.1002/cne.903560211>
- Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M. L., Schmitz, D., Gross, C., Mao, X., Engelsberg, A., Mahlke, C., Welzl, H., Kobalz, U., Stawrakakis, A., Fernandez, E., Waltereit, R., Bick-Sander, A., Therstappen, E., Cooke, S. F. F., Blanquet, V., Wurst, W., ... Kuhl, D. (2006). Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron*, 52(3), 437–444. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.024>
- Pobbe, R. L. H., Lopes, M. A., Vasconcelos, A. T., Yamashita, P. S. M., de Bortoli, V. C., y Zangrossi, H. (2014). Influence of procedural variables on rat inhibitory avoidance and escape behaviors generated by the elevated T-maze. *Behavioural Brain Research*, 273, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.024>

- Poulin, J. F., Bérubé, P., Laforest, S., y Drolet, G. (2013). Enkephalin knockdown in the central amygdala nucleus reduces unconditioned fear and anxiety. *European Journal of Neuroscience*, 37(8), 1357–1367. <https://doi.org/10.1111/ejn.12134>
- Prado-Alcalá, R. A., González-Salinas, S., Antaramián, A., Quirarte, G. L., Bello-Medina, P. C., y Medina, A. C. (2020). Imbalance in cerebral protein homeostasis: Effects on memory consolidation. *Behavioural Brain Research*, 393, 112767. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112767>
- Prado-Alcalá, R. A., Medina, A. C., López, N. S., y Quirarte, G. L. (2012). Intense emotional experiences and enhanced training prevent memory loss induced by post-training amnesic treatments administered to the striatum, amygdala, hippocampus or substantia nigra. *Reviews in the Neurosciences*, 23(5–6). <https://doi.org/10.1515/revneuro-2012-0061>
- Prado-Alcalá, R. A., Salado-Castillo, R., Quiroz, C., Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Trujillo, A., Rivas-Arancibia, S., y Quirarte, G. L. (2007). Enhanced learning protects brain against effects of amnesic treatments. En *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging*. <https://doi.org/10.1201/9781420008418.ch9>
- Price, J. L., y Amaral, D. G. (1981). An autoradiographic study of the projections of the central nucleus of the monkey amygdala. *Journal of Neuroscience*, 1(11). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.01-11-01242.1981>
- Quirarte, G. L., Galvez, R., Roozendaal, B., y McGaugh, J. L. (1998). Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock and opioid peptidergic drugs. *Brain Research*, 808(2). [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00795-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00795-1)
- Quirk, G. J., Likhtik, E., Pelletier, J. G., y Paré, D. (2003). Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. *Journal of Neuroscience*, 23(25), 8800–8807. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-25-08800.2003>
- Quiroz, C., Martínez, I., Quirarte, G. L., Morales, T., Díaz-Cintra, S., y Prado-Alcalá, R. A. (2003). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Experimental Brain Research*, 153(3), 400–402. <https://doi.org/10.1007/s00221-003-1704-1>
- Ramírez-Amaya, V., Escobar, M. L., Chao, V., y Bermú Dez-Rattoni, F. (1999). Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus*, 9(6), 1098–1063. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1999\)9:6<631::AID-HIPO3>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:6<631::AID-HIPO3>3.0.CO;2-3)
- Ressler, K. J., Paschall, G., Zhou, X. L., y Davis, M. (2002). Regulation of synaptic plasticity genes during consolidation of fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, 22(18), 7892–7902. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-18-07892.2002>
- Ressler, R. L., y Maren, S. (2019). Synaptic encoding of fear memories in the amygdala. *Current Opinion in Neurobiology*, 54, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.08.012>
- Risold, P. Y., y Swanson, L. W. (1996). Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. *Science*, 272(5267), 1484–1486. <https://doi.org/10.1126/science.272.5267.1484>

- Risold, P. Y., Thompson, R. H., y Swanson, L. W. (1997). The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex. *Brain Research Reviews*, 24(2–3), 197–254. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(97\)00007-6](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(97)00007-6)
- Roberts, A. C., Tomic, D. L., Parkinson, C. H., Roeling, T. A., Cutter, D. J., Robbins, T. W., y Everitt, B. J. (2007). Forebrain connectivity of the prefrontal cortex in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*): An anterograde and retrograde tract-tracing study. *Journal of Comparative Neurology*, 502(1), 86–112. <https://doi.org/10.1002/cne.21300>
- Robins, M. T., Li, J., y Ryabinin, A. E. (2020). Effects of Housing Conditions and Circadian Time on Baseline c-Fos Immunoreactivity in C57BL/6J Mice. *Neuroscience*, 431, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.02.006>
- Rodrigues, S. M., LeDoux, J. E., y Sapolsky, R. M. (2009). The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annual Review of Neuroscience*, 32, 289–313. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135620>
- Roosendaal, B. (2002). Stress and memory: Opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(3). <https://doi.org/10.1006/nlme.2002.4080>
- Roosendaal, B., de Quervain, D. J.-F., Ferry, B., Setlow, B., y McGaugh, J. L. (2001). Basolateral amygdala–nucleus accumbens interactions in mediating glucocorticoid enhancement of memory consolidation. *The Journal of Neuroscience*, 21(7), 2518–2525. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-07-02518.2001>
- Roosendaal, B., Griffith, Q. K., Buranday, J., De Quervain, D. J. F., y McGaugh, J. L. (2003). The hippocampus mediates glucocorticoid-induced impairment of spatial memory retrieval: Dependence on the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(3), 1328–1333. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337480100>
- Roosendaal, B., y McGaugh, J. L. (1996). Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65(1), 1–8. <https://doi.org/10.1006/nlme.1996.0001>
- Roosendaal, B., y McGaugh, J. L. (1997a). Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats. *European Journal of Neuroscience*, 9(1), 76–83. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01355.x>
- Roosendaal, B., y McGaugh, J. L. (1997b). Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration into the basolateral but not central amygdala modulates memory storage. *Neurobiology of Learning and Memory*, 67(2), 176–179. <https://doi.org/10.1006/nlme.1996.3765>
- Roosendaal, B., y McGaugh, J. L. (2011). Memory modulation. *Behavioral Neuroscience*, 125(6), 797–824. <https://doi.org/10.1037/a0026187>
- Roosendaal, B., Nguyen, B. T., Power, A. E., y McGaugh, J. L. (1999). Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Neurobiology*, 96(20), 11642–11647. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11642>

- Rooszendaal, B., Quirarte, G. L., y McGaugh, J. L. (2002). Glucocorticoids interact with the basolateral amygdala β -adrenoceptor-cAMP/cAMP/PKA system in influencing memory consolidation. *European Journal of Neuroscience*, 15(3), 553–560. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01876.x>
- Royer, S., Martina, M., y Paré, D. (1999). An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(23), 10575–10583. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-23-10575.1999>
- Saffen, D. W., Cole, A. J., Worley, P. F., Christy, B. A., Ryder, K., y Baraban, J. M. (1988). Convulsant-induced increase in transcription factor messenger RNAs in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(20), 7795–7799. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.20.7795>
- Sah, P., Faber, E. S. L., De Armentia, M. L., y Power, J. (2003). The amygdaloid complex: Anatomy and physiology. *Physiological Reviews*, 83(3), 803–834. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2003>
- Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavés, M., Quirarte, G. L., García, M. I. M., y Prado-Alcalá, R. A. (2011). Enhanced training protects memory against amnesia produced by concurrent inactivation of amygdala and striatum, amygdala and substantia nigra, or striatum and substantia nigra. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 83. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00083>
- Salomé, N., Salchner, P., Viltart, O., Sequeira, H., Wigger, A., Landgraf, R., y Singewald, N. (2004). Neurobiological correlates of high (HAB) versus low anxiety-related behavior (LAB): Differential Fos expression in HAB and LAB rats. *Biological Psychiatry*, 55(7), 715–723. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2003.10.021>
- Salz, D. M., Tiganj, Z., Khasnabish, S., Kohley, A., Sheehan, D., Howard, M. W., y Eichenbaum, H. (2016). Time cells in hippocampal area CA3. *Journal of Neuroscience*, 36(28), 7476–7484. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0087-16.2016>
- Sanyal, S., Sandstrom, D. J., Hoeffler, C. A., y Ramaswami, M. (2002). Ap-1 functions upstream of creb to control synaptic plasticity in drosophila. *Nature*, 416(6883), 807–874. <https://doi.org/10.1038/416870a>
- Saunders, R. C., Rosene, D. L., y Van Hoesen, G. W. (1988). Comparison of the efferents of the amygdala and the hippocampal formation in the rhesus monkey: II. Reciprocal and non-reciprocal connections. *Journal of Comparative Neurology*, 271(2). <https://doi.org/10.1002/cne.902710203>
- Savonenko, A., Filipkowski, R. K., Werka, T., Zielinski, K., y Kaczmarek, L. (1999). Defensive conditioning-related functional heterogeneity among nuclei of the rat amygdala revealed by c-Fos mapping. *Neuroscience*, 94(3), 723–733. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00331-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00331-0)
- Schroeder, J. P., Wingard, J. C., y Packard, M. G. (2002). Post-training reversible inactivation of hippocampus reveals interference between memory systems. *Hippocampus*, 12(2), 280–284. <https://doi.org/10.1002/hipo.10024>
- Scoville, W. B., y Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 20(1), 11–21. <https://doi.org/10.1136/jnnp.20.1.11>

- Setlow, B., y McGaugh, J. L. (1998). Sulpiride infused into the nucleus accumbens posttraining impairs memory of spatial water maze training. *Behavioral Neuroscience*, 112(3), 603–610. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.112.3.603>
- Sheng, M., Dougan, S. T., McFadden, G., y Greenberg, M. E. (1988). Calcium and growth factor pathways of c-fos transcriptional activation require distinct upstream regulatory sequences. *Molecular and Cellular Biology*, 8(7), 2787–2796. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.7.2787-2796.1988>
- Sheng, M., y Greenberg, M. E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4(4), 477–485. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90106-P](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90106-P)
- Sierra-Mercado, D., Padilla-Coreano, N., y Quirk, G. J. (2011). Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*, 36(2), 529–538. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.184>
- Somogyi, P., y Klausberger, T. (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *Journal of Physiology*, 562(1). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.078915>
- Spampanato, J., Polepalli, J., y Sah, P. (2011). Interneurons in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology*, 60(5), 765–773. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.11.006>
- Squire L. R. (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiology of learning and memory*, 82(3), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.06.005>
- Stefanacci, L., y Amaral, D. G. (2002). Some observations on cortical inputs to the macaque monkey amygdala: An anterograde tracing study. *Journal of Comparative Neurology*, 451(4). <https://doi.org/10.1002/cne.10339>
- Stewart, M., y Fox, S. E. (1990). Do septal neurons pace the hippocampal theta rhythm? *Trends in Neurosciences*, 13(5), 163–168. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90040-H](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90040-H)
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., y Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10), 655–669. <https://doi.org/10.1038/nrn3785>
- Swanson, C. J., y Kalivas, P. W. (2000). Regulation of locomotor activity by metabotropic glutamate receptors in the nucleus accumbens and ventral tegmental area. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292(1), 406–414.
- Swanson, L. W. (2000). Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Research*, 886(1–2), 113–164. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02905-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02905-X)
- Swanson, L. W., y Cowan, W. M. (1975). Hippocampo-hypothalamic connections: Origin in subicular cortex, not Ammon's horn. *Science*, 189(4199), 303–304. <https://doi.org/10.1126/science.49928>
- Swanson, L. W., y Cowan, W. M. (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferet connections of the hippocampal formation in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 172(1), 49–84. <https://doi.org/10.1002/cne.901720104>

- Swanson, L. W., y Kohler, C. (1986). Anatomical evidence for direct projections from the entorhinal area to the entire cortical mantle in the rat. *Journal of Neuroscience*, 6(10), 3010–3023. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.06-10-03010.1986>
- Tada, T., y Sheng, M. (2006). Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(1), 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.12.001>
- Taube, J. S. (2007). The head direction signal: Origins and sensory-motor integration. *Annual Review of Neuroscience*, 30, 181–207. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112854>
- Taube, J. S., Muller, R. U., y Ranck, J. B. (1990). Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis. *Journal of Neuroscience*, 10(2), 420–435. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.10-02-00420.1990>
- Thatcher, R. W., y Kimble, D. P. (1966). Effect of amygdaloid lesions on retention of an avoidance response in overtrained and non-overtrained rats. *Psychonomic Science*, 6(1), 9–10. <https://doi.org/10.3758/BF03327931>
- Thierry, A. M., Gioanni, Y., Dégénétais, E., y Glowinski, J. (2000). Hippocampo-prefrontal cortex pathway: Anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus*, 10(4), 411–419. [https://doi.org/10.1002/1098-1063\(2000\)10:4<411::AID-HIPO7>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1098-1063(2000)10:4<411::AID-HIPO7>3.0.CO;2-A)
- Tischmeyer, W., y Grimm, R. (1999). Activation of immediate early genes and memory formation. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 55(4), 564–574.
- Tonegawa, S., Pignatelli, M., Roy, D. S., y Ryan, T. J. (2015). Memory engram storage and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, 35, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.07.009>
- Torres-García, M. E., Medina, A. C., Quirarte, G. L., y Prado-Alcalá, R. A. (2017). Differential effects of inactivation of discrete regions of medial prefrontal cortex on memory consolidation of moderate and intense inhibitory avoidance training. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 842. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00842>
- Treisman, R. (1986). Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell*, 46(4), 567–574. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90882-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90882-2)
- Treves, A., Tashiro, A., Witter, M. E., y Moser, E. I. (2008). What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience*, 154(4), 1155–1172. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.073>
- Ubeda-Bañon, I., Novejarque, A., Mohedano-Moriano, A., Pro-Sistiaga, P., de la Rosa-Prieto, C., Insausti, R., Martínez-García, F., Lanuza, E., y Martínez-Marcos, A. (2007). Projections from the posterolateral olfactory amygdala to the ventral striatum: Neural basis for reinforcing properties of chemical stimuli. *BMC Neuroscience*, 8, 103. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-103>
- Ubeda-Bañon, I., Novejarque, A., Mohedano-Moriano, A., Pro-Sistiaga, P., Insausti, R., Martínez-García, F., Lanuza, E., y Martínez-Marcos, A. (2008). Vomeronasal inputs to the rodent ventral striatum. *Brain Research Bulletin*, 75(2–4), 467–473. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.10.028>

- Van Groen, T., y Wyss, J. M. (2003). Connections of the retrosplenial granular b cortex in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 463(3), 249–263. <https://doi.org/10.1002/cne.10757>
- Vann, S. D., Brown, M. W., Erichsen, J. T., y Aggleton, J. P. (2000). Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests. *Journal of Neuroscience*, 20(7), 2711–2718. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-07-02711.2000>
- Vazdarjanova, A., Cahill, L., y McGaugh, J. L. (2001). Disrupting basolateral amygdala function impairs unconditioned freezing and avoidance in rats. *European Journal of Neuroscience*, 14(4), 709–718. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816X.2001.01696.x>
- Vazdarjanova, A., y McGaugh, J. L. (1999). Basolateral amygdala is involved in modulating consolidation of memory for classical fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, 19(15), 6615–6622. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-15-06615.1999>
- Vazdarjanova, A., McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Worley, P. F., y Guzowski, J. F. (2002). Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes arc and Homer 1a in hippocampal and neocortical neuronal networks. *The Journal of neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(23), 10067–10071. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-23-10067.2002>
- Vogt, B. A., y Miller, M. W. (1983). Cortical connections between rat cingulate cortex and visual, motor, and postsubicular cortices. *Journal of Comparative Neurology*, 216(2), 192–210. <https://doi.org/10.1002/cne.902160207>
- Voorn, P., Vanderschuren, L. J. M. J., Groenewegen, H. J., Robbins, T. W., y Pennartz, C. M. A. (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences*, 27(8), 468–474. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.06.006>
- Vouimba, R.-M., Yaniv, D., y Richter-Levin, G. (2007). Glucocorticoid receptors and β -adrenoceptors in basolateral amygdala modulate synaptic plasticity in hippocampal dentate gyrus, but not in area CA1. *Neuropharmacology*, 52(1), 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.07.007>
- Wahis, J., Baudon, A., Althammer, F., Kerspern, D., Goyon, S., Hagiwara, D., Lefevre, A., Barteczko, L., Boury-Jamot, B., Bellanger, B., Abatis, M., Da Silva Gouveia, M., Benusiglio, D., Eliava, M., Rozov, A., Weinsanto, I., Knobloch-Bollmann, H. S., Kirchner, M. K., Roy, R. K., Wang, H., ... Charlet, A. (2021). Astrocytes mediate the effect of oxytocin in the central amygdala on neuronal activity and affective states in rodents. *Nature neuroscience*, 24(4), 529–541. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00800-0>
- Wang, X. Bin, Bozdagi, O., Nikitczuk, J. S., Zu, W. Z., Zhou, Q., y Huntley, G. W. (2008). Extracellular proteolysis by matrix metalloproteinase-9 drives dendritic spine enlargement and long-term potentiation coordinately. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49), 19520–19525. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807248105>

- Wang, Z., Frederick, J., y Garabedian, M. J. (2002). Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 277(29), 26573–26580. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110530200>
- Wang, Y., Romani, S., Lustig, B., Leonardo, A., y Pastalkova, E. (2015). Theta sequences are essential for internally generated hippocampal firing fields. *Nature Neuroscience*, 18(2), 282–288. <https://doi.org/10.1038/nn.3904>
- Werner, W., Hoffmann, K. P., y Dannenberg, S. (1997). Anatomical distribution of arm-movement-related neurons in the primate superior colliculus and underlying reticular formation in comparison with visual and saccadic cells. *Experimental Brain Research*, 115(2), 206–216. <https://doi.org/10.1007/PL00005691>
- White, N. M., y McDonald, R. J. (2002). Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 77(2), 125–184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/nlme.2001.4008>
- Wilson, D. A. (2009). Pattern separation and completion in olfaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170, 306–312. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04017.x>
- Witter, M. P. (2010). Connectivity of the hippocampus. En *Hippocampal Microcircuits* (pp. 5–26). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0996-1_1
- Witter, M. P., y Groenewegen, H. J. (1990). The subiculum: Cytoarchitecturally a simple structure, but hodologically complex. *Progress in Brain Research*, 83, 47–58. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)61240-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)61240-6)
- Yang, Y., y Wang, J. Z. (2017). From structure to behavior in basolateral amygdala-hippocampus circuits. En *Frontiers in Neural Circuits* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00086>
- Yassa, M. A., y Stark, C. E. L. (2011). Pattern separation in the hippocampus. *Trends in Neurosciences*, 34(10), 515–525. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.06.006>
- Yasuda, S., Tanaka, H., Sugiura, H., Okamura, K., Sakaguchi, T., Tran, U., Takemiya, T., Mizoguchi, A., Yagita, Y., Sakurai, T., De Robertis, E. M., y Yamagata, K. (2007). Activity-induced protocadherin arcadlin regulates dendritic spine number by triggering N-cadherin endocytosis via TAO2 β and p38 MAP kinases. *Neuron*, 56(3), 456–471. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.08.020>
- Zhang, Y., Fukushima, H., y Kida, S. (2011). Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Molecular Brain*, 4, 4. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-4>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El concepto del procesamiento en paralelo.....	13
Figura 2. Evolución de la amígdala entre especies.	15
Figura 3. Corte coronal de la amígdala teñido con Nissl.	17
Figura 4. Anatomía y conectividad de la amígdala durante el condicionamiento del miedo en ratas. La amígdala consta de varios núcleos que son parte integral de la adquisición y retención de los recuerdos del miedo.....	22
Figura 5. Comparación entre especies de la anatomía del hipocampo. a. Ilustraciones esquemáticas de la orientación del eje largo del hipocampo en ratas, monos macacos y humanos.....	25
Figura 6. Corte coronal teñido con Nissl del hipocampo de rata.	27
Figura 7. Circuito trisináptico del hipocampo basado en el cerebro de la rata.	28
Figura 8. Diseño experimental de la prueba de extinción.....	43
Figura 9. Diseño experimental histología.	43
Figura 10. Cámara de evitación inhibitoria.	44
Figura 11. El entrenamiento aversivo intenso produjo una mayor resistencia a la extinción que el entrenamiento moderado. Mediana de las latencias (\pm rango intercuartilar) de los grupos de ratas entrenadas en evitación inhibitoria con 0.0 (grupo de contexto), 1.0 o 3.0 mA.	51
Figura. 12. Imágenes representativas de las porciones BLa, BLp, LA y CE de la amígdala, de cada una de las condiciones de tratamiento: Bio, Solo choque de 3.0 mA (SC-3) y entrenado con 0.0 (contexto), 1.0 o 3.0 mA.....	52
Figura 13. Después de un entrenamiento aversivo intenso y moderado un mayor número de células positivas a c-Fos es reclutada en la región basolateral anterior de la amígdala. (A) Las células que expresaron c-Fos fueron contabilizadas en el núcleo lateral (LA), el núcleo central (CE) y la porción posterior (BLp) y anterior (BLa) del núcleo basolateral de la amígdala (BL); modificado de Paxinos y Watson (2007). Promedio (\pm SEM) del porcentaje de células que expresan la proteína c-Fos en LA (D); en CE (E); en BL (B) y en BLa y BLp (C).	54
Figura 14. Imágenes representativas del GD, CA1 y CA3 del hipocampo, de cada una de las condiciones de tratamiento: Bio, Solo choque de 1.0 mA (SC-1), Solo choque de 3.0 mA (SC-3) y entrenado con 0.0 (contexto), 1.0 o 3.0 mA.....	57
Figura 15. Después de un entrenamiento aversivo moderado un mayor número de células positivas a c-Fos es reclutada en la región del giro dentado del hipocampo. (A) Las células que expresaron c-Fos fueron contabilizadas en la porción del giro dentado (GD), CA1 y CA3 del hipocampo (modificado de Paxinos y Watson, 2007). Promedio (\pm SEM) del porcentaje de células que expresan la proteína c-Fos en GD (B); CA1 (C); y en CA3 (D).	58

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Bio. Grupo control de vida

BL. Núcleo basal de la amígdala

BLa. Núcleo basolateral anterior de la amígdala

BLA. Complejo basolateral de la amígdala

BLp. Núcleo basolateral anterior de la amígdala

BLv. Núcleo basolateral ventral de la amígdala

BM. Núcleo basomedial de la amígdala, Núcleo basomedial de la amígdala

BNST. Núcleo del lecho de la estría terminal

CA. Cuerno de Amón, hipocampo

CE. Núcleo central de la amígdala

CEl. Núcleo central lateral de la amígdala

CEm. Núcleo central medial de la amígdala

DG. Giro dentado del hipocampo

EI. Evitación inhibitoria

IEGs. Genes de expresión temprana

LA. Núcleo lateral de la amígdala

NAc. Núcleo acumbens

SC-1. Grupo control de choque 1.0 mA

SC-3. Grupo control de choque 3.0 mA

APÉNDICE

Publicación como primer autor

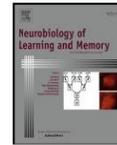
Neurobiology of Learning and Memory 181 (2021) 107428



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Learning and Memory

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynlme



Recruitment of neurons in basolateral amygdala after intense training produces a stronger memory trace

C.X. Ruiz-López^a, A.C. Medina^a, P.C. Bello-Medina^{b,c}, G.L. Quirarte^a, R.A. Prado-Alcalá^{a,*}

^a Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro 76230, Mexico

^b Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Qro. 76230, Mexico

^c División de Ciencias de Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma, Estado de México 52005, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Basolateral amygdala
c-Fos
Intense training
Inhibitory avoidance
Extinction

ABSTRACT

Typical amnesic treatments are ineffective when administered to subjects trained in aversively-motivated tasks using relatively high foot-shock intensities. This effect has been found when treatments that disrupt neuronal activity are administered to different regions of the brain, including the amygdala. However, the molecular mechanisms induced by this intense training are unknown. We made a detailed mapping of c-Fos-expressing neurons in four regions of the amygdala after moderate and intense one-trial inhibitory avoidance training. Rats were sacrificed 90 min after training or after appropriate control procedures, and their brains were prepared for immunohistochemical c-Fos protein detection in the central, lateral, and in the anterior and posterior parts of the basolateral amygdaloid nucleus. We found a high percentage of neurons expressing c-Fos in the anterior part of the basolateral nucleus after moderate training, and this percentage increased further after intense training. Moderate and intense training did not induce changes in c-Fos expression in the other explored amygdaloid regions. These results show that inhibitory avoidance training produces a localized expression of c-Fos in the basolateral anterior nucleus of the amygdala, which is dependent upon the intensity of training, and indicate that synaptic plastic changes in this region may be required for the formation of memory of moderate and intense aversive learning.

1. Introduction

One of the first steps involved in memory formation is the rapid induction of transcription of immediate early genes (IEGs) in the brain (Leslie & Nedivi, 2011; Radulovic, Kammermeier, & Spiess, 1998; Ressler, Paschall, Zhou, & Davis, 2002; Rosen, Fanselow, Young, Sircoske, & Maren, 1998). The IEGs that encode for transcription factors have been extensively studied as indirect markers of neuronal activity. The most used IEGs to map neuronal activity are *c-fos*, *c-jun*, and *zif268* (Tischmeyer & Grimm, 1999). Expression of c-Fos protein, a product of the *c-fos* gene, in neurons is induced by a wide range of sensory stimuli (Hunt, Pini, & Evan, 1987; Kovács, 1998; Rusak, Robertson, Wisden, & Hunt, 1990) and several studies have demonstrated its role in neuronal plasticity by regulating downstream gene expression (Guzowski, 2002;

Kovács, 2008). Recent genetic studies have consistently shown that the deletion of the *c-fos* gene (Fleischmann et al., 2003) or administration of antisense oligonucleotides of *c-fos* (Katche et al., 2010) impairs memory consolidation, without affecting learning or short-term memory (Guzowski, 2002; Yasoshima, Sako, Senba, & Yamamoto, 2006). Brains of naïve animals are characterized by a low number of c-Fos positive cells while some structures show a relatively high number of c-Fos positive neurons after learning (Bertaina-Anglade, Tramu, & Destraide, 2000; Casanova et al., 2016; He, Yamada, & Nabeshima, 2002; Martinez et al., 2013; Robins, Li, & Ryabinin, 2020; Zhang, Fukushima, & Kida, 2011), and the distribution of c-Fos positive neurons in different brain structures seems to depend on the learning paradigm (e.g., Filipkowski, Knapska, & Kaczmarek, 2006; Gill, Bernstein, & Mizumori, 2007) although there is a lack of reports dealing with the amount of neurons

* Corresponding author at: Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Juriquilla, Querétaro, Qro 76230, Mexico.
E-mail address: prado@unam.mx (R.A. Prado-Alcalá).

<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2021.107428>

Received 10 October 2020; Received in revised form 18 March 2021; Accepted 28 March 2021

Available online 30 March 2021

1074-7427/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

expressing c-Fos after intense training¹.

Numerous studies have shown that the amygdala plays a central role in learned fear and in forming and expressing fear memories (Ambrogio, Baldi, Bucherelli, Sacchetti, & Tassoni, 1999; Fanselow & LeDoux, 1999; LeDoux, 2000; McGaugh, 2000, 2015; McGaugh, Cahill, & Roozendaal, 1996; Roozendaal, McEwen, & Chattarji, 2009; Wilensky, Schafe, Kristensen, & LeDoux, 2006). Many experimental findings regarding Pavlovian fear conditioning have led to the proposal that, within the amygdala, the lateral nucleus (LA) is necessary for the association of conditioned and unconditioned stimuli, which results in plastic changes necessary for the formation of a memory trace in the basolateral nucleus (BL), while subsequent exposure to the conditioned stimulus induces the expression of the conditioned fear response through the activation of the central nucleus (CE) (for a recent review see Ressler & Maren, 2019).

On the other hand, several experimental findings suggest that typical amnesic treatments are ineffective when administered to rats that have been subjected to high foot-shock intensities during aversive learning. This protective effect has been found in a variety of learning tasks when treatments that disrupt neuronal activity are administered to several regions of the brain (Prado-Alcalá, Medina, López, & Quirarte, 2012), including the amygdala (Thatcher & Kimble, 1966; Parent & McGaugh, 1994; Parent, Quirarte, Cahill, & McGaugh, 1995; Salado-Castillo, Sánchez-Alavéz, Quirarte, Martínez García, & Prado-Alcalá, 2011). However, the mechanisms of this protective effect are unknown.

In the present study we made a detailed mapping of c-Fos, focusing on the three regions of the amygdala mentioned above, after moderate and intense inhibitory avoidance (IA) training, a task with a strong instrumental component, where c-Fos expression has only been barely studied (Zhang et al., 2011). It was important, therefore, to investigate whether c-Fos expression of LA, CE, and BL, described after Pavlovian fear conditioning, also occurs after IA. We predicted that moderate training would induce c-Fos expression in cells of the basolateral nucleus of the amygdala because it is intimately involved in memory consolidation of IA (McGaugh & Roozendaal, 2002; McGaugh, McIntyre, & Power, 2002; Roozendaal & McGaugh, 1996, 1997, 2011; Roozendaal, de Quervain, Ferry, Setlow, & McGaugh, 2001; Roozendaal, Quirarte, & McGaugh, 2002; Vazdarjanova, Cahill, & McGaugh, 2001); a second prediction was that intense training would further increase the number of c-Fos expressing neurons in BL, for the reason that intense training recruits a larger population of neurons in the striatum, which is directly connected to the amygdala (McDonald, 1991; Voorn, Vanderschuren, Groenewegen, Robbins, & Pennartz, 2004) and is closely related to memory consolidation of IA (González-Franco, Ramírez-Amaya, Joseph-Bravo, Prado-Alcalá, & Quirarte, 2017). The most important implication of this prediction is that recruitment of more neurons in the BL, after intense training, would produce a larger memory ensemble, that could induce structural changes in target cerebral regions, producing a stronger, more distributed memory trace that is protected from effects of BL lesions.

2. Material and methods

All the experimental procedures were approved by the Bioethics Committee of the Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, and were carried out according to the guidelines of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the NIH (National Research Council, 2011).

2.1. Animals

Sixty male Wistar rats without prior experimental experience,

weighing 250–350 g were individually housed, with water and food *ad libitum* and maintained in a room with a 12 h/12 h light-dark cycle (lights on at 7:00 h); training and testing were performed during the light phase of the cycle, between 9:00 and 14:00 h. The temperature of the room was 23 ± 1 °C. The rats were randomly assigned to each group. Before the experiments were started, subjects received 5-min daily handling sessions for three consecutive days.

2.2. Behavioral procedures

A detailed description of the behavioral procedures has been provided elsewhere (Prado-Alcalá, Medina, Bello-Medina, & Quirarte, 2017). Briefly, training and testing were conducted in a two-compartment box separated by means of a sliding door. The safe, illuminated compartment had a grid floor, and the opposite compartment had V-shaped lateral stainless-steel walls which were continuous with half the floor; there was a 1.5-cm slot separating each half floor. Thus, when in this compartment, the rats were in contact with both walls and floor, which could be electrified using a square-pulse stimulator connected in series to a constant current unit. On the day of training each animal was put inside the safe compartment; 10 s later the door dividing the two compartments was opened and the latency to cross to the shock compartment was measured (training latency). When the animals crossed to this compartment the door was closed and a foot-shock (1.0 or 3.0 mA) was delivered. Five seconds later the door was reopened, allowing the animal to escape to the safe compartment and the stimulator was turned off; this latency was also measured (escape latency). After 30 s in the safe compartment the animal was put back in its home cage. An additional group was subjected to the same training procedure except that the foot-shock was omitted (0.0 mA, Context group).

There were 16 rats in each group. Six rats from each group were sacrificed 90 min after training for immunohistochemical analysis (see below) and the remaining 10 rats from each group were further studied as follows: Forty-eight hours after training, extinction of the task was measured on seven consecutive days (E1-E7). Because we wanted to investigate if intense training would produce a lasting resistance to extinction, an additional extinction session was carried out at the fifteenth day after training (E8). During the extinction sessions the same procedure of training was followed except that the foot-shock was not delivered; if the animal did not cross to the shock compartment within 600 s a retention latency score of 600 was assigned and the session ended.

2.3. Immunohistochemistry

The number of c-Fos positive neurons in amygdala after moderate (1.0 mA) and intense (3.0 mA) training were counted in the groups that were sacrificed after training. We also studied three controls groups: a Naïve group (rats that were kept under identical living conditions as the animals used for the behavioral study, but they never left the bioterium, except for euthanasia), the Context group defined above (rats “trained” in the task, but were not foot-shocked); and a shock-only group (SO group, rats that were placed in the shock compartment and received an unescapable non-contingent 3.0 mA foot-shock of the mean duration of the group that had been trained with 3.0 mA); immediately after the foot-shock the rats were returned to their home cage. Each of these groups was composed of 6 rats. The rats from each group were sacrificed 90 min after training or after the control procedures and their brains were prepared for immunohistochemical c-Fos protein detection in the central (CE), lateral (LA), and basolateral (BL) amygdaloid nuclei, as defined by Paxinos and Watson (2007). For immunohistochemistry, rats were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (100 mg/kg) and perfused with 150 mL ice-cold 0.9% saline solution followed by 200 mL of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate-buffer via the ascending aorta. Brains were removed, post-fixed in the same solution for 3 h and cryoprotected overnight with 15% sucrose in phosphate-buffer and then

¹ In the case of one-trial inhibitory avoidance, intense training refers to conditioning motivated by relatively high intensities of foot-shock, which produces a higher resistance to extinction than lower foot-shock intensities.

with 30% sucrose in phosphate-buffer.

Four frozen coronal sections of 30 μm that contained the right and left amygdala (bregma from -2.40 to -3.36 mm) were cut with the aid of a CM1850 Leica cryostat. Slices were collected and stored in a cryoprotectant solution (15% sucrose, 30% v/v ethylene glycol in 0.1 M phosphate-buffer) at -20 °C. Free-floating sections were rinsed in phosphate-buffered saline (PBS), incubated in 3% H_2O_2 , and then washed with PBS. After blocking with 5% normal goat serum (Jackson ImmunoResearch) and 1% triton X-100 (Merck) in the tyramide signal amplification kit (TSA) blocking buffer (PerkinElmer Life Sciences) for 60 min, the free-floating sections were incubated at 4 °C with rabbit anti c-Fos antibody (1:2000; Abcam) for 48 h. Subsequently, sections were washed with PBS and incubated for 1 h at room temperature with anti-rabbit biotinylated secondary antibody (1:200; Vector Laboratories), then washed with PBS, followed by incubation for 1 h at room temperature using the amplification avidin-biotin system (Vector Laboratories). The immunostaining was visualized using FITC (TSA fluorescence system, PerkinElmer Life Sciences), and the nuclei were counterstained with DAPI (1:5000; Sigma-Aldrich). The stained sections were covered with fluorescence mounting medium (Vectashield, Vector Laboratories).

2.4. Image acquisition and analysis

Thirty z-stack images (1 μm optical thickness per plane) from CE, LA, and BL were obtained using a 40x (0.8 NA) objective of an Apotome system (Carl Zeiss Imager Z1 coupled to an AxioCamMR3 camera). In each slide, the parameters for image acquisition were set from a slice of an animal of the Naïve group; once these parameters were set they remained constant for the brain slices from each of the other groups contained in that slide (González-Franco et al., 2017). Analysis of the c-Fos expression was performed on the images using ImageJ software.

The cell count method was previously reported by Vazdarjanova, McNaughton, Barnes, Worley, and Guzowski (2002). Only cells that were presumptive neurons, with large nuclei stained diffusely with DAPI, and found in the middle 60% of each stack were included in the analyses (this stereological measure was used to minimize sampling errors attributable to incomplete cells). Positive cells had staining in at least 50% of their nuclei and had to be visible in at least three planes of the z-stack. These criteria permitted to differentiate these cells from putative glial cells whose nuclei were identified based on their small size (~ 5 μm in diameter) and on their bright, uniform nuclear DAPI counterstaining.

2.5. Statistical analyses

Because the measurement of IA retention tests was truncated at 600 s, nonparametric statistics were used in analyzing the behavioral results. Independent Kruskal–Wallis ANOVAs were computed for acquisition and escape latencies on the day of training, and for retention latencies among groups on each day of extinction. For retention latencies across the 8 days of extinction of each group the Friedman test was used. When appropriate, the post-hoc multiple comparisons Dunn's Multiple Comparison Test was computed. The percentages of c-Fos expressing cells [(Total of c-Fos positive cells/Total of cells) \times 100] were analyzed using one-way or two-way ANOVAs followed by post-hoc Bonferroni tests where appropriate.

3. Results

3.1. Behavior

Because one of the main objectives of this study was to evaluate possible changes in c-Fos expression after moderate and intense IA training, it was necessary to operationally define "moderate" and "intense" training. To this end we measured the effects of 1.0 mA and

3.0 mA foot-shocks used for training upon resistance to extinction, which is a progressive decline in the magnitude of a conditioned response that is no longer reinforced. It is used as a measure of strength of learning since resistance to extinction is stronger when the learning experience is also stronger.

The Kruskal–Wallis test showed that there were no significant differences among the groups with regard to training latencies ($H(2) = 1.36, p = 0.507$), but it indicated significant differences among the groups in escape latencies ($H(2) = 31.97, p < 0.0001$); we expected that the 1.0 and 3.0 mA groups would show lower escape latencies than the Context (0.0 mA) group because they were motivated to escape from the aversive stimulation. Indeed, this was the case. The Context group had a higher escape latency than the 1.0 and 3.0 mA groups ($p = 0.0001$ for each comparison), while this latency did not differ between the latter two groups (Dunn's test), as depicted in Fig. 1A and B.

When analyzing the retention latencies of each group across the eight extinction sessions, the Friedman test showed significant differences in the Context group ($Q(7) = 15.86, p = 0.026$); Dunn's Multiple Comparisons test revealed only a significant, small reduction in retention latency between the seventh session (E7) relative to the first session (E1) ($p < 0.01$), which does not reflect behavioral extinction because this group did not receive a foot-shock during training. In the case of the 1.0 mA group the Friedman test also yielded a significant difference among extinction sessions ($Q(7) = 46.19, p < 0.0001$). Dunn's test indicated significant reductions in retention latencies when comparing E1 against E6, E7, and E8 ($p < 0.01, < 0.001, \text{ and } < 0.01$, respectively). With respect to the 3.0 mA group, there were no significant differences among the extinction sessions ($Q(7) = 9.77, p = 0.202$) (Fig. 1C).

The Kruskal–Wallis test showed significant differences among the groups on each of the eight extinction sessions ($H(2) = 22.09$ to 25.00

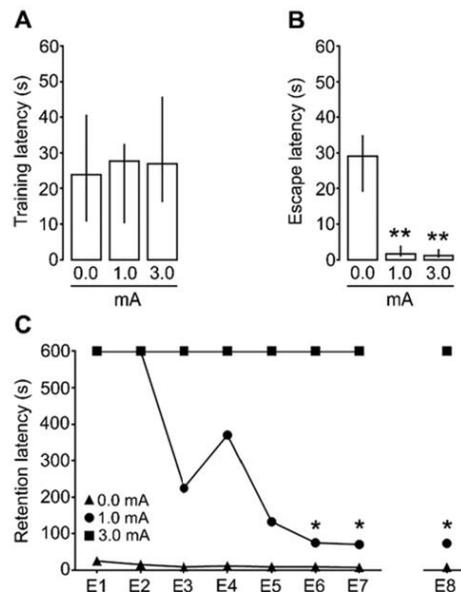


Fig. 1. Medians (with interquartile ranges) of training (A) and escape (B) latency scores of groups of rats trained in one-trial IA with 0.0 mA (Context group), 1.0 mA, or 3.0 mA. (C) Retention latencies across the daily extinction sessions (E1–E7) and the additional session run 15 days after training (E8). (B) $** p < 0.0001$ vs 0.0 mA. (C) $* p < 0.05$ vs E1 in group 1.0 mA. (A) and (B) $n = 16$ rats per group; (C) $n = 10$ rats per group; see text for details.

for all sessions, $p < 0.0001$ for each session). The Dunn's Multiple Comparison test revealed that the Context group had significantly lower latencies as compared with the 1.0 mA group on the first ($p < 0.001$), second ($p < 0.001$), third ($p < 0.01$), and fourth ($p < 0.01$) extinction sessions; it also differed with the 3.0 mA group on the eight extinction sessions ($p < 0.0001$ for each comparison). Lastly, the 1.0 mA group had lower retention latencies than the 3.0 mA group on the last four extinction sessions ($p < 0.05$ for each comparison) (Fig. 1C).

3.2. *c-Fos* immunostaining

Immunostaining of *c-Fos* was examined 90 min after IA training with a moderate (1.0 mA) or intense (3.0 mA) foot-shock. These groups were compared to the Naïve, SO, and Context groups. Fig. 2 shows examples of microphotographs of *c-Fos* immunostaining and DAPI detection.

In a first analysis, we compared the percentage of *c-Fos* expressing cells among the Naïve groups of BL, CE, and LA. The one-way ANOVA showed that there were no significant differences among the groups (F

(2,15) = 1.054, $p = 0.373$).

3.2.1. Basolateral amygdala

The one-way ANOVA revealed a significant treatment effect on the percentage of *c-Fos* expressing cells after IA training ($F(4,25) = 6.631$, $p = 0.0009$). The post-hoc analysis (Bonferroni test) showed a higher percentage of *c-Fos* expressing cells in the 3.0 mA group than in the Naïve ($p < 0.001$), Context ($p < 0.05$), and 1.0 mA ($p < 0.05$) groups, but it did not differ significantly from the SO group. Mean percentage of *c-Fos* expressing cells: Naïve, 0.48%; SO, 1.72%; Context, 1.22%; 1.0 mA, 1.36%; and 3.0 mA, 2.90%.

Given this result, and because there is a fair amount of literature showing that the basolateral amygdala is involved in memory consolidation of IA (Roozendaal & McGaugh, 1996, 1997, 2011), we decided to explore this region in more detail. To this end we explored, individually, the anterior (BLa) and posterior (BLp) parts of this amygdaloid region. The two-way ANOVA showed significant treatment ($F(4,50) = 10.083$, $p < 0.0001$) and region ($F(1,50) = 45.586$, $p < 0.0001$) effects, as well as

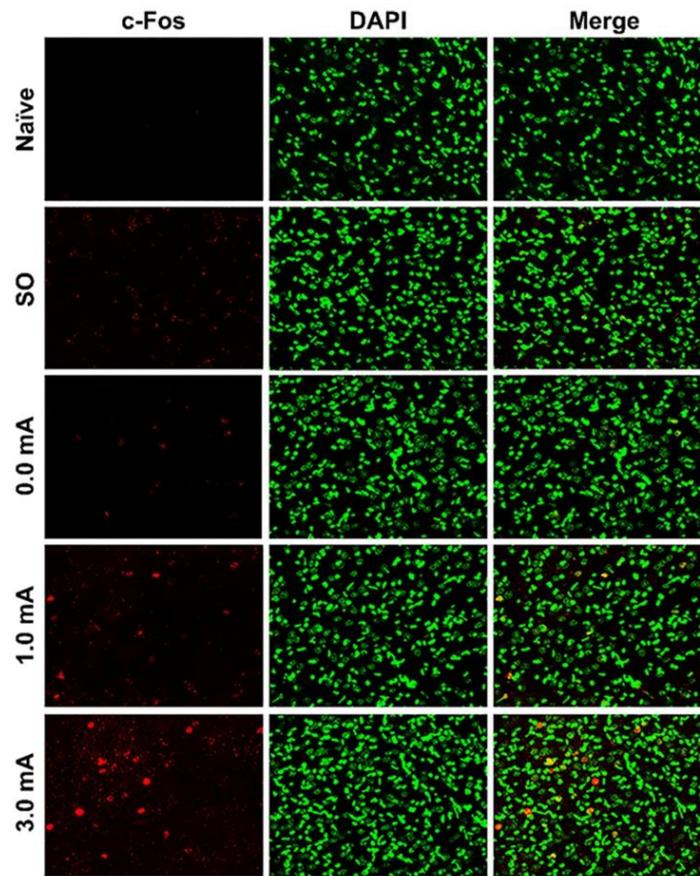


Fig. 2. Representative images of BLa, from each of the treatment conditions: Naïve, Shock only (SO), and trained with 0.0 (context), 1.0, or 3.0 mA, showing *c-Fos* immunostaining, counterstained with DAPI for nuclei detection, and a merge image of *c-Fos* and nuclei. *c-Fos* and DAPI immunostaining were colored red and green, respectively, irrespective of native fluorescent labeling. Scale bar = 50 μm .

a significant interaction between these two factors ($F(4,50) = 2.928$, $p < 0.03$). The post hoc Bonferroni test revealed that the BLa nucleus of the 3.0 mA group had a higher percentage of c-Fos cells than the rest of the groups ($p < 0.001$ vs. Naïve; < 0.01 vs. SO; $p < 0.001$ vs. Context; $p < 0.001$ vs. 1.0 mA); and the 1.0 mA and SO groups had a higher percentage of c-Fos cells than the Naïve group ($p < 0.05$ and < 0.01 , respectively). Interestingly, when analyzing the BLp, the Bonferroni test showed that there were no significant differences between any of the groups (Fig. 3B). When comparing the effects of each of the treatments on c-Fos expression between BLa and BLp we found that the Naïve groups did not differ from each other, nor did the Context groups. By contrast, the SO, 1.0 mA, and 3.0 mA BLa groups showed a higher percentage of c-Fos positive cells than the corresponding BLp groups (p 's < 0.05 , < 0.05 , and < 0.001 , respectively). Mean percentage of c-Fos expressing cells in BLa: Naïve, 0.83%; SO, 2.54%; Context, 1.80%; 1.0 mA, 2.18%; and 3.0 mA, 4.51%; and mean percentage of c-Fos expressing cells in BLp: Naïve, 0.09%; SO, 0.92%; Context, 0.62%; 1.0 mA, 0.54%; and 3.0 mA, 1.25% (Fig. 3B).

3.2.2. Central amygdala

The one-way ANOVA showed no significant treatment effects on c-Fos expression among the groups ($F(4, 25) = 1.219$, $p = 0.328$). The mean percentage of c-Fos expressing cells was: Naïve, 0.24%; SO, 0.85%; Context, 0.71%; 1.0 mA, 0.78%; and 3.0 mA, 1.32% (Fig. 3C).

3.2.3. Lateral amygdala

The one-way ANOVA showed no significant differences in c-Fos expression among the groups ($F(4, 25) = 1.905$; $p = 0.141$). The mean percentage of c-Fos expressing cells was: Naïve, 0.16%; SO, 0.84%;

Context, 0.91%; 1.0 mA, 0.72%; and 3.0 mA, 0.97% (Fig. 3D).

4. Discussion

The principal findings of this study were that moderate IA training increased the number of c-Fos expressing cells localized to BLa, and that this expression was further increased after intense training. The differences in number of c-Fos cellular expression in the BLa associated to the intensity of IA training had not, to our knowledge, been noted before. In contrast, no changes in c-Fos expression were found in BLp, CE, and LA, regardless of the intensity of the foot-shock used for training. These findings partially confirm those of Zhang et al. (2011) who found induction of c-Fos expression in BL but not in CE, as in our case, but they also found heightened expression in LA after IA training. One possible explanation for the differences between our results and the results of Zhang et al. (2011) may rest on the use of different rodent species; our work was done in rats while they studied mice, and there is evidence indicating that protein synthesis in the brains of these murine species follow different patterns, as revealed after protein synthesis inhibition (Prado-Alcalá et al., 2020). It is important to note that strong and weak training of step-down IA produced c-Fos expression in the hippocampus 1 h after training, but at 24 h post-training only strong training induced increased c-Fos. However, the immunoblot assays they used did not allow for counting the number of c-Fos activated cells (Katche et al., 2010).

The non-contingent high foot-shock produced increased c-Fos expression only in BLa, albeit significantly smaller than that produced by the intense training. Simple exposure to the conditioning context failed to produce changes in c-Fos expression in any of the nuclei

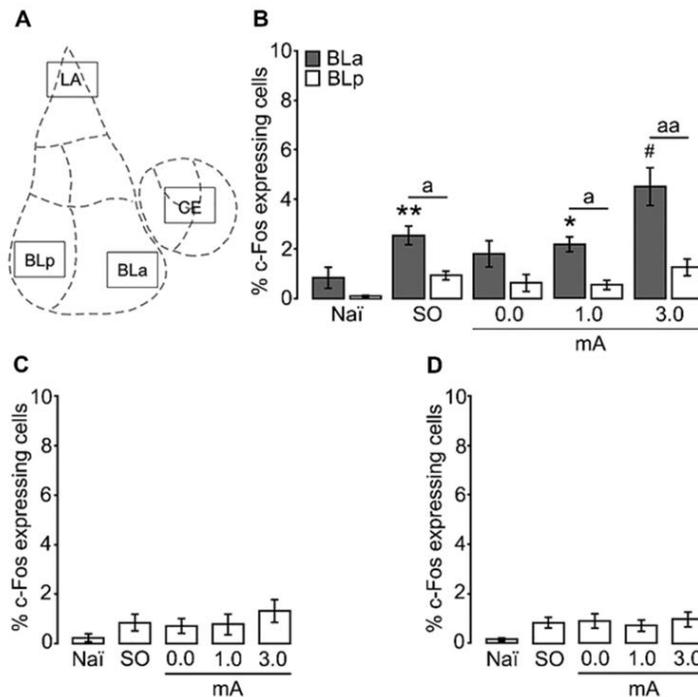


Fig. 3. (A) c-Fos expressing cells were tallied in the posterior (BLp) and anterior (BLa) parts of the basolateral nucleus, and in the central nucleus (CE) and the lateral nucleus (LA) of the amygdala; redrawn from Paxinos and Watson (2007). Mean (\pm SEM) percentage of c-Fos protein expressing cells in BLa and BLp (B); in CE (C); and in LA (D). Naï, Naïve group; SO, shock-only group; 0.0, Context group; 1.0 and 3.0, groups trained with 1.0 and 3.0 mA, respectively. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, vs BLa Naïve; # $p < 0.01$ vs each of the rest of BLa groups; a $p < 0.05$ BLa vs BLp; aa $p < 0.001$ BLa vs BLp. There were six rats in each of the five treatment conditions ($n = 30$); see text for details.

explored. These findings indicate that BLA is not only sensitive to the learning of IA, but also to the aversive properties of the conditioning stimulus, but not to the contextual cues present in the IA task, as gauged with c-Fos activity. This agrees with research showing an increment of c-Fos positive cells in the BLA, but not in BLp, as a result of non-contingent foot-shock (Kim, Pignatelli, Xu, Itohara, & Tonegawa, 2016).

It should be pointed out that the relatively low percentages of positive c-Fos nuclei found in the four areas explored in the present study (less than 1% in the Naïve groups) agree well with the low amount of c-Fos in neurons reported by other researchers in basal conditions or in well-habituated animals (Hale, Bouwknecht, Spiga, Shekhar, & Lowry, 2006; Kaczmarek, 2002; Martínez et al., 2013; Radwanska, Nikolaev, Knapska, & Kaczmarek, 2002; Savonenko, Filipkowski, Werka, Zielinski, & Kaczmarek, 1999).

An important issue in this study has to do with the validity of the assumption that the foot-shock intensities used for IA training clearly distinguished between moderate and intense training. As high resistance to extinction is a hallmark of strong (intense) learning, we expected that training with the high-intensity foot-shock would yield a higher resistance to extinction than training with the lower foot-shock; indeed, this was the case. There were no signs of extinction in the 3.0 mA group, as it displayed optimal retention scores in all the extinction sessions spanning a period of 15 days post-training while a progressive decline in retention was observed in the 1.0 mA group showing that from the fourth to the last extinction sessions its performance was not significantly different from the Context (0.0 mA) group. These results agree well with previous findings from our laboratory, where training of IA with the high aversive stimulation used in the present study also produced a stronger resistance to extinction than training with the low aversive stimulation (Garín-Aguilar et al., 2012; Gonzalez et al., 2014; Bello-Medina, Flores, Quirarte, McGaugh, & Prado Alcalá, 2016). Comparable findings have also been reported by Kathe et al. (2010) after training with relatively high and low foot-shock intensities in a step-down IA task.

Our results show that c-Fos was expressed in BLA, but not in BLp, CE nor LA after IA training; we assume that BLA was activated during the process of acquisition, because c-fos expression and c-Fos translation is transient, and the observed c-Fos positive cells are related to the behavioral stimulation that occurred 90 min before the immunohistochemical procedures were carried out (Kovács, 2008). This assumption is congruent with the reports which indicate that c-Fos is produced in BL during acquisition of Pavlovian fear conditioning. In LA and CE c-Fos is also involved in consolidation and retrieval of this type of associative learning, respectively (Ressler & Maren, 2019). In the case of IA, it remains to be investigated whether c-Fos is also expressed in LA and CE during retrieval. Thus, it seems that activation of c-Fos is a good marker of the involvement of the amygdala in learning of Pavlovian fear conditioning and of the IA instrumental task.

However, inconsistent results have been obtained regarding the expression of c-Fos in the amygdala after training of active avoidance. Savonenko et al. (1999) conducted a detailed study making correlations in CE, LA, BL, and other amygdaloid nuclei, between expression of c-Fos and each of a number of dependent variables related to the acquisition of a multiple-trial two-way active avoidance task. They found that c-Fos activation does not correlate with the learned response; instead c-Fos immunoreactivity in some of these nuclei correlated with the number of intertrial responses and grooming, and the authors suggested that LA, BL, and medial nuclei are critically involved in long-term modulation of anxiety (Savonenko et al., 1999). On the other hand, when rats were trained in a Sidman active avoidance task, which allowed for differentiating between good and poor avoiders, it was found that in the former c-Fos correlated with avoidance performance in LA, CE, medial amygdala, basal amygdala, and infralimbic prefrontal cortex, but not in another 20 distinct areas of the brain (Martínez et al., 2013). More recently, Jiao, Beck, Myers, Servatius, and Pang (2015) reported that during acquisition of lever press active avoidance in rats there was no change in the expression of c-Fos in LA and basal nuclei, but there was

increased expression in CE.

These discrepancies could be accounted for by the procedural differences involved in these tasks. In the Savonenko et al. (1999) study, a commonly used active avoidance training paradigm was followed where a discrete conditions stimulus (CS) signals the impending presentation of an unconditioned stimulus (UCS), and good performance depends on crossing over to the safe compartment of the shuttle box right after the CS to avoid the UCS; in the Sidman task used by Martínez et al. (2013) the animal avoids the UCS through internal timing that predicts the UCS; and in the lever-press avoidance task studied by Jiao et al. (2015) the rat performs a lever-press response that prevents the UCS. These procedural differences may involve different physiological processes that may recruit diverse neuronal circuits within and/or outside the amygdala.

A long-standing line of research has revealed that treatments that typically interfere with memory consolidation become ineffective in conditions of intense training. For example, cholinergic blockade or reversible inactivation of the striatum in rats induces amnesia of inhibitory avoidance learning trained with relatively low foot-shock intensities, but such effect is offset when relatively high intensities are used (Giordano & Prado-Alcalá, 1986; Pérez-Ruiz & Prado-Alcalá, 1989). The same effects were observed after reversible inactivation of the hippocampus (Garín-Aguilar, Medina, Quirarte, McGaugh, & Prado-Alcalá, 2014; Quiroz et al., 2003), medial prefrontal cortex (Torres-García, Medina, Quirarte, & Prado-Alcalá, 2017), amygdala and substantia nigra (Salado-Castillo et al., 2011), and after infusions of protein synthesis inhibitors into the striatum (González-Franco, Bello-Medina, Serafín, Prado-Alcalá, & Quirarte, 2019) and hippocampus (Medina et al., 2019). Equivalent effects of intense training against amnesic treatments have been reported in a variety of both positively and aversively motivated learning tasks (Prado-Alcalá et al., 2012).

Notwithstanding the amount of behavioral evidence showing the protective effect of intense training, very little is known about its underlying mechanisms. Some evidence points to plastic morphological reorganization that occurs as a consequence of enhanced training. It has been found that Morris Water Maze overtraining induces a significant increase in mossy fiber terminals and synaptic density in CA3 stratum oriens (Ramírez-Amaya, Escobar, Chao, & Bermúdez-Rattoni, 1999), as well as augmented density of thorny excrescences in the basal dendrites of CA3 pyramidal neurons (Gómez-Padilla et al., 2020). In the case of IA, intense training brings about enhanced mushroom spino-genesis in the dorsomedial aspect of the anterior striatum (Bello-Medina et al., 2016). These findings suggest that these types of plastic changes at the synaptic level, induced by enhanced training, are important events that participate in what must be a complex mechanism underlying the protective effect against amnesic treatments.

We found an increment in the number of c-Fos expressing cells in BLA after IA training and after the non-contingent foot-shock; an additional increase of this type of cell was produced by intense training. These data suggest that BLA participates in the encoding of information necessary for acquisition of moderate and intense IA, and of the aversive properties of the foot-shock. These results closely parallel the recent findings of González-Franco et al. (2017) where a direct relationship was found between the number of active cells and the intensity of IA training in the ventral aspect of the anterior striatum of rats. As stated above, enhanced spino-genesis is induced in dorsal striatum by intense IA training, and it was also found that non-contingent foot-shock stimulates spino-genesis in both accumbens shell and core (Bello-Medina et al., 2016). These data point to a close functional relationship among these cerebral regions as the basolateral amygdala has efferent connections with dorsal striatum and with core and shell regions of nucleus accumbens (McDonald, 1991; Mulder, Hodenprijl, & Lopes da Silva, 1998; Heidbreder & Groenewegen, 2003; Voom et al., 2004). It thus seems that the BLA plays a pivotal role as an integrator of information derived from the associative processes involved in IA training and from the characteristics of the aversive stimulation, which eventually will activate the striatum and the nucleus accumbens, respectively. Along these lines, Pelletier, Likhnik, Filali, and

Paré (2005), observed continued cellular activity in the BL following IA training in cats, and concluded that this activity produced Hebbian plasticity in target structures.

The morphological and functional changes produced by intense training could be mechanisms underlying its protective effect against amnesic treatments. In other words, an enhanced learning experience would lead to the activation of a higher number of neurons in widespread areas of the brain, and this would be accompanied by increased spinogenesis. Thus, administration of amnesic treatments in one area of the brain would become ineffective because more neurons (or structures) would be involved in the formation of the memory trace (Prado-Alcalá et al., 2007).

Of note is the functional differentiation observed between BLA and BLp. As mentioned above, BLA expressed c-Fos cells as a function of the strength of aversive training, whereas no changes in expression were evident in BLp. A report by Kim et al. (2016) may shed light on this differential neuronal behavior. They found that stimuli that elicit negative behaviors (e.g., foot-shocks) produce recruitment of c-Fos positive cells in BLA, while stimuli that elicit positive behaviors (e.g., sucrose) recruit c-Fos positive cells in BLp. They found further that both photoinhibition of BLA and photoactivation of BLp reduced conditioned freezing. These findings suggest that activation of BLA and BLp neurons mediate opposing behaviors perhaps through reciprocal inhibition, indicating that, probably, activation of BLA inhibits expression of c-Fos in BLp.

The present study showed that BLA is activated after IA training, indicating that it is involved in the acquisition of this behavior. An important body of research has shown that expression of memories of aversive stimuli can persist if there is adequate time for consolidation before the amygdala is inactivated and it has also been reported that acquisition and retention of increased IA training were not blocked by amygdala lesions (Lehmann, Treit, & Parent, 2000; Parent et al., 1995; Parent, Tomaz, & McGaugh, 1992; Parent, West, & McGaugh, 1994). Additional evidence indicates that the basolateral amygdala modulates memory consolidation via efferents to other brain regions (McGaugh, 2002, 2004; Packard, Cahill, & McGaugh, 1994; Vazdarjanova & McGaugh, 1999). Taken together, these findings suggest that the storage of inhibitory avoidance memory may be located outside of the amygdala.

5. Conclusions

The predictions that c-Fos would be expressed in BL after IA training, and that this expression would be heightened after intense training of this task were met. Together with results of other studies, it is clear that in the case of aversively motivated learning, production of c-Fos in the different regions of the amygdala is dependent upon the type and intensity of the learning task being studied. The findings of the present study and related studies suggest that, compared with moderate training, intense training results in recruitment of a higher number of neurons within the BLA as well as in increased spinogenesis in target regions outside of the BLA, which may contribute to the formation of a stronger memory trace.

CRedit authorship contribution statement

C.X. Ruiz-López: Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **A.C. Medina:** Methodology, Formal analysis, Investigation, Supervision, Project administration, Writing - original draft, Writing - review & editing. **P.C. Bello-Medina:** Methodology, Validation, Supervision, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **G.L. Quirarte:** Resources, Writing - review & editing. **R.A. Prado-Alcalá:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing, Supervision, Resources, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We thank N. Serafín, B. Osorio, E. N. Hernández, A. González, M. García, A. Castilla, O. González, R. Martínez, and N. Aranda for their excellent technical and administrative assistance, and Dr. M. Jeziorski for his helpful comments on the manuscript.

This research was supported by grants provided by Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (PAPIIT 203918) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 237570). C. X. Ruiz-López is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and has received a CONACYT fellowship (304833).

References

- Ambrogio, L. C. G., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., & Tassoni, G. (1999). Neural topography and chronology of memory consolidation: A review of functional inactivation findings. *Neurobiology of Learning and Memory*, 71(1), 1–18. <https://doi.org/10.1006/nlme.1998.3865>.
- Bello-Medina, P. C., Flores, G., Quirarte, G. L., McGaugh, J. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2016). Mushroom spine dynamics in medium spiny neurons of dorsal striatum associated with memory of moderate and intense training. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(42), E6516–E6525. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613680113>.
- Bertagna-Anglade, V., Tramu, G., & Destradre, C. (2000). Differential learning-stage dependent patterns of c-Fos protein expression in brain regions during the acquisition and memory consolidation of an operant task in mice. *European Journal of Neuroscience*, 12(10), 3803–3812. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00258.x>.
- Casanova, J. P., Madrid, C., Contreras, M., Rodríguez, M., Vazquez, M., & Torrealba, F. (2016). A role for the interoceptive insular cortex in the consolidation of learned fear. *Behavioural Brain Research*, 296, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.08.032>.
- Fanselow, M. S., & LeDoux, J. E. (1999). Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron*, 23(2), 229–232. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80775-9](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80775-9).
- Filipkowski, R. K., Knapka, E., & Kaczmarek, L. (2006). c-Fos and Zif268 in learning and memory—Studies on expression and function. In R. Pinnaud, & L. A. Tremere (Eds.), *Immediate early genes in sensory processing, cognitive performance and neurological disorders* (pp. 137–158). Boston, MA: Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-33604-6_8.
- Fleischmann, A., Hvalby, O., Jensen, V., Strelakova, T., Zacher, C., Lauer, L. E., ... Gass, P. (2003). Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. *Journal of Neuroscience*, 23(27), 9116–9122. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-27-09116.2003>.
- Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Cintra, S., Quirarte, G. L., Aguilar-Vázquez, A., Medina, A. C., & Prado-Alcalá, R. A. (2012). Extinction procedure induces pruning of dendritic spines in CA1 hippocampal field depending on strength of training in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00012>.
- Garín-Aguilar, M. E., Medina, A. C., Quirarte, G. L., McGaugh, J. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2014). Intense aversive training protects memory from the amnesic effects of hippocampal inactivation. *Hippocampus*, 24(1), 102–112. <https://doi.org/10.1002/hipo.22210>.
- Gill, K. M., Bernstein, I. L., & Mizumori, S. J. (2007). Immediate early gene activation in hippocampus and dorsal striatum: Effects of explicit place and response training. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87(4), 583–596. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.12.011>.
- Giordano, M., & Prado-Alcalá, R. A. (1986). Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen. Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24(4), 905–909. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90435-1](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90435-1).
- Gómez-Padilla, E., Bello-Medina, P. C., León-Jacinto, U., Orta-Salazar, E., Quirarte, G. L., Ramírez-Amaya, V., ... Díaz-Cintra, S. (2020). Morris water maze overtraining increases the density of thorny excrescences in the basal dendrites of CA3 pyramidal neurons. *Behavioural Brain Research*, 3(379), 112373. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112373>. Erratum. In: *Behavioural Brain Research*. 2020, 20(384), pp. 112523. PMID: 31759047.
- Gonzalez, M. C., Kramar, C. P., Tomaiuolo, M., Katche, C., Weisstaub, N., Cammarota, M., & Medina, J. H. (2014). Medial prefrontal cortex dopamine controls the persistent storage of aversive memories. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 408. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00408>.
- González-Franco, D. A., Bello-Medina, P. C., Serafín, N., Prado-Alcalá, R. A., & Quirarte, G. L. (2019). Effects of anisomycin infusions into the dorsal striatum on

- memory consolidation of intense training and neurotransmitter activity. *Brain Research Bulletin*, 150, 250–260. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.06.005>.
- González-Franco, D. A., Ramírez-Amaya, V., Joseph-Bravo, P., Prado-Alcalá, R. A., & Quirarte, G. L. (2017). Differential Arc protein expression in dorsal and ventral striatum after moderate and intense inhibitory avoidance training. *Neurobiology of Learning and Memory*, 140, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.02.001>.
- Guzowski, J. F. (2002). Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus*, 12(1), 86–104. <https://doi.org/10.1002/hipo.10010>.
- Hale, M. W., Bouwknecht, J. A., Spiga, F., Shekhar, A., & Lowry, C. A. (2006). Exposure to high- and low-light conditions in an open-field test of anxiety increases c-Fos expression in specific subdivisions of the rat basolateral amygdaloid complex. *Brain Research Bulletin*, 71(1–3), 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.09.001>.
- He, J., Yamada, K., & Nabeshima, T. (2002). A role of Fos expression in the CA3 region of the hippocampus in spatial memory formation in rats. *Neuropsychopharmacology*, 26(2), 259–268. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00332-3](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00332-3).
- Heidbreder, C. A., & Groenewegen, H. J. (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: Evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(6), 555–579. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.09.003>.
- Hunt, S. P., Pini, A., & Ewan, G. (1987). Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 328(6131), 632–634. <https://doi.org/10.1038/328632a0>.
- Jiao, X., Beck, K. D., Myers, C. E., Servatius, R. J., & Pang, K. C. (2015). Altered activity of the medial prefrontal cortex and amygdala during acquisition and extinction of an active avoidance task. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9, 249. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00249>.
- Kaczmarek, L. (2002). c-Fos in learning: Beyond the mapping of neuronal activity. In L. Kaczmarek, & H. Robertson (Eds.), *Handbook of chemical neuroanatomy: Immediate early genes and inducible transcription factors in mapping of the central nervous system function and dysfunction* (pp. 189–216). Elsevier.
- Katche, C., Bekinschtein, P., Slipczuk, L., Goldin, A., Izquierdo, I. A., Cammarota, M., & Medina, J. H. (2010). Delayed wave of c-Fos expression in the dorsal hippocampus involved specifically in persistence of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(11), 349–354. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912931107>.
- Kim, J., Pignatelli, M., Xu, S., Itoharu, S., & Tonegawa, S. (2016). Antagonistic negative and positive neurons of the basolateral amygdala. *Nature Neuroscience*, 19(12), 1636–1646. <https://doi.org/10.1038/nn.4414>.
- Kovács, K. J. (1998). c-Fos as a transcription factor: A stressful (re)view from a functional map. *Neurochemistry International*, 33(4), 287–297. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(98\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(98)00023-0).
- Kovács, K. J. (2008). Measurement of immediate-early gene activation c-fos and beyond. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6), 665–672. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01734.x>.
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 155–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.155>.
- Lehmann, H., Treit, D., & Parent, M. B. (2000). Amygdala lesions do not impair shock-probe avoidance retention performance. *Behavioral Neuroscience*, 114(1), 107–116. <https://psycnet.apa.org/doi/10.1037/0735-7044.114.1.107>.
- Leslie, J. H., & Nedivi, E. (2011). Activity-regulated genes as mediators of neural circuit plasticity. *Progress in Neurobiology*, 94(3), 223–237. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.05.002>.
- Martínez, R. C., Gupta, N., Lázaro-Muñoz, G., Sears, R. M., Kim, S., Moscarello, J. M., ... Cain, C. K. (2013). Active vs. reactive threat responding is associated with differential c-Fos expression in specific regions of amygdala and prefrontal cortex. *Learning & Memory*, 20(8), 446–452. <https://doi.org/10.1101/lm.031047.113>.
- McDonald, A. J. (1991). Topographical organization of amygdaloid projections to the caudateputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. *Neuroscience*, 44(1), 15–33. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90249-m](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90249-m).
- McGaugh, J. L. (2000). Memory—a century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248–251. <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.248>.
- McGaugh, J. L. (2002). Memory consolidation and the amygdala: A systems perspective. *Trends in Neurosciences*, 25(9), 456. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02211-7](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02211-7).
- McGaugh, J. L. (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 1–28. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144157>.
- McGaugh, J. L. (2015). Consolidating memories. *Annual Review of Psychology*, 66, 1–24. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010814-014954>.
- McGaugh, J. L., Cahill, L., & Roozendaal, B. (1996). Involvement of the amygdala in memory storage: Interaction with other brain systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), 13508–13514. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13508>.
- McGaugh, J. L., McIntyre, C. K., & Power, A. E. (2002). Amygdala modulation of memory consolidation: Interaction with other brain systems. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(3), 539–552. <https://doi.org/10.1006/nlme.2002.4082>.
- McGaugh, J. L., & Roozendaal, B. (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(2), 205–210. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(02\)00306-9](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(02)00306-9).
- Medina, A. C., Torres-García, M. E., Rodríguez-Serrano, L. M., Bello-Medina, P. C., Quirarte, G. L., McGaugh, J. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2019). Inhibition of transcription and translation in dorsal hippocampus does not interfere with consolidation of memory of intense training. *Neurobiology of Learning and Memory*, 166, Article 107092. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.107092>.
- Mulder, A. B., Hodeprijl, M. G., & Lopes da Silva, F. H. (1998). Electrophysiology of the hippocampal and amygdaloid projections to the nucleus accumbens of the rat: Convergence, segregation, and interaction of inputs. *Journal of Neuroscience*, 18(13), 5095–5102. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-13-05095.1998>.
- National Research Council (2011). Guide for the care and use of laboratory animals (8th ed.). National Academy of Sciences. <https://doi.org/10.17226/12910>.
- Packard, M. G., Cahill, L., & McGaugh, J. L. (1994). Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(18), 8477–8481. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.18.8477>.
- Parent, M. B., & McGaugh, J. L. (1994). Posttraining infusion of lidocaine into the amygdala basolateral complex impairs retention of inhibitory avoidance training. *Brain Research*, 661(1–2), 97–103. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91186-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91186-x).
- Parent, M. B., Quirarte, G. L., Cahill, L., & McGaugh, J. L. (1995). Spared retention of inhibitory avoidance learning after posttraining amygdala lesions. *Behavioral Neuroscience*, 109(4), 803–807. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.109.4.803>.
- Parent, M. B., Tomaz, C., & McGaugh, J. L. (1992). Increased training in an aversively motivated task attenuates the memory-impairing effects of posttraining N-methyl-D-aspartate-induced amygdala lesions. *Behavioral Neuroscience*, 106(5), 789–797. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.106.5.789>.
- Parent, M. B., West, M., & McGaugh, J. L. (1994). Memory of rats with amygdala lesions induced 30 days after footshock-motivated escape training reflects degree of original training. *Behavioral Neuroscience*, 108(6), 1080–1087. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.108.6.1080>.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates (6th ed.)*. Academic Press.
- Pelletier, J. G., Likhrik, E., Filali, M., & Paré, D. (2005). Lasting increases in basolateral amygdala activity after emotional arousal: Implications for facilitated consolidation of emotional memories. *Learning & Memory*, 12(2), 96–102. <https://doi.org/10.1101/lm.88605>.
- Pérez-Ruiz, C., & Prado-Alcalá, R. A. (1989). Retrograde amnesia induced by lidocaine injection into the striatum: Protective effect of the negative reinforcer. *Brain Research Bulletin*, 22(4), 599–603. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(89\)90076-2](https://doi.org/10.1016/0361-9230(89)90076-2).
- Prado-Alcalá, R. A., González-Salinas, S., Antaramián, A., Quirarte, G. L., Bello-Medina, P. C., & Medina, A. C. (2020). Imbalance in cerebral protein homeostasis: Effects on memory consolidation. *Behavioural Brain Research*, 393, 112767. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112767>.
- Prado-Alcalá, R. A., Medina, A. C., Bello-Medina, P. C., & Quirarte, G. L. (2017). Inhibition of transcription and translation in the striatum after memory reactivation: Lack of evidence of reconsolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 142(Pt A), 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.018>.
- Prado-Alcalá, R. A., Medina, A. C., López, N. S., & Quirarte, G. L. (2012). Intense emotional experiences and enhanced training prevent memory loss induced by post-training amnesic treatments administered to the striatum, amygdala, hippocampus or substantia nigra. *Reviews in the Neurosciences*, 23(5–6), 501–508. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2012-0061>.
- Prado-Alcalá, R. A., Salado-Castillo, R., Quiroz, C., Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Trujillo, A., Rivas-Arancibia, S., & Quirarte, G. L. (2007). Enhanced Learning Protects Brain against Effects of Amnesic Treatments. In F. Bermúdez-Rattoni (Ed.), *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging*. CRC Press/Taylor & Francis.
- Quiroz, C., Martínez, I., Quirarte, G. L., Morales, T., Díaz-Cintra, S., & Prado-Alcalá, R. A. (2003). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Experimental Brain Research*, 153(3), 400–402. <https://doi.org/10.1007/s00221-003-1704-1>.
- Radulovic, J., Kammermeier, J., & Spiess, J. (1998). Relationship between fos production and classical fear conditioning: Effects of novelty, latent inhibition, and unconditioned stimulus preexposure. *Journal of Neuroscience*, 18(18), 7452–7461. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-18-07452.1998>.
- Radwanska, K., Nikolov, E., Knapaska, E., & Kaczmarek, L. (2002). Differential response of two subdivisions of lateral amygdala to aversive conditioning as revealed by c-Fos and p-ERK mapping. *Neuroreport*, 13(17), 2241–2246. <https://doi.org/10.1097/00001756-200212030-00015>.
- Ramírez-Amaya, V., Escobar, M. L., Chao, V., & Bermúdez-Rattoni, F. (1999). Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus*, 9(6), 631–636. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1999\)9:6<631::AID-HIPO3>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:6<631::AID-HIPO3>3.0.CO;2-3).
- Ressler, K. J., Paschall, G., Zhou, X. L., & Davis, M. (2002). Regulation of synaptic plasticity genes during consolidation of fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, 22(18), 7892–7902. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-18-07892.2002>.
- Ressler, R. L., & Maren, S. (2019). Synaptic encoding of fear memories in the amygdala. *Current Opinion in Neurobiology*, 54, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.08.012>.
- Robins, M. T., Li, J., & Ryabinin, A. E. (2020). Effects of housing conditions and circadian time on baseline c-Fos immunoreactivity in C57BL/6J mice. *Neuroscience*, 431, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.02.006>.
- Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1996). Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65(1), 1–8. <https://doi.org/10.1006/nlme.1996.0001>.
- Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1997). Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration to the basolateral but not central amygdala modulates memory storage. *Neurobiology of Learning and Memory*, 67(2), 176–179. <https://doi.org/10.1006/nlme.1996.3765>.

- Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (2011). Memory modulation. *Behavioral Neuroscience*, 125(6), 797–824. <https://doi.org/10.1037/a0026187>.
- Roozendaal, B., de Quervain, D. J., Ferry, B., Setlow, B., & McGaugh, J. L. (2001). Basolateral amygdala-nucleus accumbens interactions in mediating glucocorticoid enhancement of memory consolidation. *Journal of Neuroscience*, 21(7), 2518–2525. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-07-02518.2001>.
- Roozendaal, B., McEwen, B. S., & Chattarji, S. (2009). Stress, memory and the amygdala. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 423–433. <https://doi.org/10.1038/nrn2651>.
- Roozendaal, B., Quirarte, G. L., & McGaugh, J. L. (2002). Glucocorticoids interact with the basolateral amygdala beta-adrenoceptor-cAMP/cAMP/PKA system in influencing memory consolidation. *European Journal of Neuroscience*, 15(3), 553–560. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01876.x>.
- Rosen, J. B., Fanselow, M. S., Young, S. L., Sircoske, M., & Maren, S. (1998). Immediate-early gene expression in the amygdala following footshock stress and contextual fear conditioning. *Brain Research*, 796(1–2), 132–142. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00294-7](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00294-7).
- Rusak, B., Robertson, H. A., Wisden, W., & Hunt, S. P. (1990). Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Science*, 248(4960), 1237–1240. <https://doi.org/10.1126/science.2112267>.
- Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavéz, M., Quirarte, G. L., Martínez García, M. I., & Prado-Alcalá, R. A. (2011). Enhanced training protects memory against amnesia produced by concurrent inactivation of amygdala and striatum, amygdala and substantia nigra, or striatum and substantia nigra. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 83. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00083>.
- Savonenko, A., Filipkowski, R. K., Werka, T., Zielinski, K., & Kaczmarek, L. (1999). Defensive conditioning-related functional heterogeneity among nuclei of the rat amygdala revealed by c-Fos mapping. *Neuroscience*, 94(3), 723–733. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00331-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00331-0).
- Thatcher, R. W., & Kimble, D. P. (1966). Effect of amygdaloid lesions on retention of an avoidance response in overtrained and non-overtrained rats. *Psychonomic Science*, 6(1), 9–10. <https://doi.org/10.3758/BF03327931>.
- Tischmeyer, W., & Grimm, R. (1999). Activation of immediate early genes and memory formation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55(4), 564–574. <https://doi.org/10.1007/s000180050315>.
- Torres-García, M. E., Medina, A. C., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2017). Differential effects of inactivation of discrete regions of medial prefrontal cortex on memory consolidation of moderate and intense inhibitory avoidance training. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 842. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00842>.
- Vazdarjanova, A., Cahill, L., & McGaugh, J. L. (2001). Disrupting basolateral amygdala function impairs unconditioned freezing and avoidance in rats. *European Journal of Neuroscience*, 14(4), 709–718. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01696>.
- Vazdarjanova, A., & McGaugh, J. L. (1999). Basolateral amygdala is involved in modulating consolidation of memory for classical fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, 19(15), 6615–6622. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-15-06615.1999>.
- Vazdarjanova, A., McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Worley, P. F., & Guzowski, J. F. (2002). Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes arc and Homer 1a in hippocampal and neocortical neuronal networks. *Journal of Neuroscience*, 22(23), 10067–10071. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-23-10067.2002>.
- Voorn, P., Vanderschuren, L. J., Groenewegen, H. J., Robbins, T. W., & Pennartz, C. M. (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences*, 27(8), 468–474. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.06.006>.
- Wilensky, A. E., Schafe, G. E., Kristensen, M. P., & LeDoux, J. E. (2006). Rethinking the fear circuit: The central nucleus of the amygdala is required for the acquisition, consolidation, and expression of Pavlovian fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, 26(48), 12387–12396. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4316-06.2006>.
- Yasoshima, Y., Sako, N., Senba, E., & Yamamoto, T. (2006). Acute suppression, but not chronic genetic deficiency, of c-fos gene expression impairs long-term memory in aversive taste learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(18), 7106–7111. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600869103>.
- Zhang, Y., Fukushima, H., & Kida, S. (2011). Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Molecular Brain*, 4, 4. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-4>.