

2020
Expresión de la proteína c-Fos en el estriado de ratas
después de un entrenamiento moderado o incrementado en
la tarea de evitación inhibitoria

Jonathan Josué
Sánchez Yépez



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

**Expresión de la proteína c-Fos en el estriado de ratas
después de un entrenamiento moderado o incrementado
en la tarea de evitación inhibitoria**

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Biología

Presenta:

Jonathan Josué Sánchez Yépez

Santiago de Querétaro, Qro.

Agosto, 2020.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología

Expresión de la proteína c-Fos en el estriado de ratas después de un
entrenamiento moderado o incrementado en la tarea de evitación inhibitoria

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Biología

Presenta:

Jonathan Josué Sánchez Yépez

Dirigido por:

Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá

SINODALES

Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá
Presidente

Lic. Cloy Xunaxi Ruiz López
Secretario

Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos
Vocal

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez
Suplente

Dra. Mónica Elisa Queijeiro Bolaños
Suplente

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Neurobiología, por haberme dado acceso a toda la infraestructura material e intelectual necesarias para la realización de esta tesis.

En especial a mi tutor, el Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá, por recibirme en su laboratorio, por el apoyo y la confianza que me brindó y sobre todo por siempre tener tiempo de charlar y aclarar mis dudas.

A la Biol. Clio Xunaxi Ruiz López, por su infinita paciencia, confianza, consejos y por compartir conmigo parte de su vasto conocimiento, pero sobre todo por enseñarme que un buen trabajo se logra con mucho esfuerzo y dedicación.

A la Dra. Mónica Elisa Queijeiro Bolaños, por su excelente enseñanza y asesoría en una de las áreas más complicadas para mí, la estadística, tanto durante la licenciatura como en este trabajo.

A los Doctores Marco Antonio Sánchez Ramos y Carlos Saldaña Gutiérrez, quienes son dos de mis más grandes ejemplos académicos a seguir, por sus maravillosas clases y con ellas nutrir mi interés por las neurociencias.

A la Dra. Gina Quirarte, quien siempre me brindo su apoyo y confianza. A la Dra. Andrea Cristina Medina Fragoso por sus observaciones y asesorías teóricas durante el inicio del proyecto. A la M.V.Z. Norma Serafín López, por el apoyo técnico y los consejos que me brindó. Al Sr. Bernardino Osorio, por la atención y cuidado brindados a los animales de experimentación.

A los integrantes del Laboratorio de Memoria y Aprendizaje, con quienes compartí gratos momentos y de quienes aprendí mucho durante mi estancia como tesista, especialmente a Antonio, Carlos, Rogelio, Alhelí y Daniel.

A los encargados de las unidades de apoyo del Instituto de Neurobiología: Bioterio, M.V.Z. José Martín García Servín; Microscopia, Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos; Cómputo, Ing. Ramón Martínez Olvera.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado al Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá (Clave del proyecto 237570).

Al programa de Apoyo a Proyectos de investigación e innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico por el apoyo de investigación otorgado al Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá (Clave del proyecto IN203918).

*A mis amigos y compañeros, pero sobre todo a mi familia, la razón de haber
llegado tan lejos y seguir adelante.*

Resumen

Diversos trabajos han observado que tratamientos que comúnmente producen amnesia son totalmente inefectivos cuando se administran a sujetos que han sido entrenados con un choque eléctrico de alta intensidad en un aprendizaje aversivo (entrenamiento incrementado). Este efecto protector ha sido observado en una variedad de tareas de aprendizaje cuando los tratamientos que interrumpen la actividad normal son administrados en varias regiones cerebrales, incluyendo el estriado. Sin embargo, los mecanismos de este efecto protector son poco conocidos. Uno de los primeros blancos para la formación de la memoria de largo plazo parece ser la activación de factores de transcripción, como la proteína c-Fos. Esta proteína ha sido empleada como un marcador para identificar las regiones del cerebro que son activadas en respuesta al aprendizaje. En el presente trabajo, analizamos el porcentaje de células positivas a c-Fos en el estriado después de un entrenamiento aversivo moderado e intenso. Las ratas fueron entrenadas en una tarea de evitación inhibitoria (EI) usando diferentes intensidades de choque eléctrico (1.0 mA o 3.0 mA). También estudiamos tres grupos controles; un grupo que no fue entrenado (Bio, ratas que permanecieron en el bioterio), un grupo de 0.0 mA (ratas “entrenadas” en la tarea, pero el choque eléctrico no fue administrado) y un grupo control de solo choque (Sch, ratas que recibieron un choque eléctrico no contingente de 3.0 mA). Las ratas de cada grupo fueron sacrificadas 90 min después de cada condición, para implementar la técnica de inmunofluorescencia para la proteína c-Fos en las regiones dorsomedial (DM), dorsolateral (DL), ventromedial (VM) y ventrolateral (VL) del estriado. Observamos un porcentaje mayor de células que expresan c-Fos en VL en el grupo entrenado con 3.0 mA comparado con el resto de los grupos, los cuales no difirieron entre sí. Concluimos que los cambios en la plasticidad sináptica en la región VL del estriado, que son dependientes de la expresión de c-Fos, pueden ser requeridos para la formación de la memoria de un entrenamiento incrementado más que para un entrenamiento moderado. Sin embargo, el hecho de no encontrar diferencias significativas en los sujetos sometidos a un entrenamiento moderado o en las otras regiones del estriado aquí analizadas, no descarta la posibilidad de que estas regiones se encuentren involucradas en la formación de la memoria de la tarea de evitación inhibitoria bajo ambas condiciones de estimulación aversiva y que puedan existir tiempos de expresión diferenciales dependiendo de las regiones, debidas a procesamiento temporal diferente de la información derivada del entrenamiento.

Palabras claves: estriado, proteína c-Fos, aprendizaje y memoria, entrenamiento aversivo.

Abstract

Several studies have observed that treatments that commonly cause amnesia are totally ineffective when administered to subjects who have been trained with a high intensity electric shock during aversive learning (enhanced training). This protective effect has been seen in a variety of learning tasks when the treatments that disrupt normal activity are administered in various brain regions, including the striatum. However, the mechanisms of this protective effect are little known. One of the first targets for stimulus-induced long-term memory formation appears to be activation of transcription factors, such as the c-Fos protein. This protein has been used as a marker to identify regions of the brain that are activated in response to learning. In the present work, we analyzed the percentage of c-Fos positive cells in the striatum after moderate and intense aversive training. Rats were trained in an inhibitory avoidance task (IE) using different intensities of electric foot-shock (1.0 mA or 3.0 mA). We also studied four control groups: a group that never left the bioterium, except for sacrificing (Bio), a 0.0 mA group (rats "trained" on the task, but the electric foot-shock was not administered), and a shock-only control group (rats that received a 3.0 mA non-contingent electric foot-shock). The rats of each group were sacrificed 90 min after each condition for immunofluorescence of the c-Fos protein in the dorsomedial (DM), dorsolateral (DL), ventromedial (VM) and ventrolateral (VL) of the striatum. We observed a higher percentage of cells expressing c-Fos in the ventrolateral striatum in the 3.0 mA group as compared with the rest of the groups, which did not differ between each other. We conclude that changes in synaptic plasticity in the VL, which are dependent on c-Fos expression, probably may be required primarily for memory formation of enhanced training and not for moderate training. However, the fact there were no significant differences in c-Fos expression in the subjects that underwent moderate training, or in the other striatal regions analyzed here, does not rule out the possibility that these regions are involved in memory formation of the inhibitory avoidance task under both training conditions, and that there may be differential expression times depending on the regions, due to a different temporary processing of information derived from training.

Key words: Striatum, c-Fos protein, learning and memory, aversive training.

ÍNDICE

Agradecimientos.....	III
Resumen.....	V
Abstract.....	VI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
1. ASPECTOS GENERALES DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.....	3
1.1. Aprendizaje.....	3
1.2. Memoria.....	5
1.3. Consolidación de la memoria.....	7
2. MARCADORES DE ACTIVACIÓN CELULAR.....	8
2.1. c-Fos como marcador de activación.....	9
3. ESTRIADO.....	13
3.1. Anatomía.....	13
3.2. Aferencias y Eferencias.....	15
4. PARTICIPACIÓN DEL ESTRIADO EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA MEMORIA DE LARGO PLAZO.....	17
5. EFECTO DEL ENTRENAMIENTO AVERSIVO INCREMENTADO.....	20
III. JUSTIFICACIÓN.....	23
VI. HIPÓTESIS.....	24
IV. OBJETIVO GENERAL.....	24
V. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	24
VII. METODOLOGIA.....	24
1. Animales.....	25
2. Tarea de evitación inhibitoria.....	25
2.1. Aparatos.....	25
2.2. Entrenamiento.....	26
2.3. Grupos experimentales y controles.....	27
3. Análisis histológico.....	27
3.1. Inmunohistoquímica de fluorescencia.....	28
3.2. Captura de imágenes.....	29
4. Análisis estadístico.....	31
4.1. Conductual.....	31

4.2. Histológico	31
VIII. RESULTADOS.....	31
1. Tarea de evitación inhibitoria	31
2. Efecto del entrenamiento moderado e incrementado sobre la expresión de la proteína c-Fos.....	32
IX. DISCUSIÓN	37
X. CONCLUSION	41
XI. Referencias.....	42

Dirección General de Bibliotecas UAQ

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Condicionamiento clásico.....	4
Figura 2. Condicionamiento operante.....	5
Figura 3. Modelo teórico del proceso de formación de la memoria.	6
Figura 4. Modelo de expresión génica de procesos de plasticidad sináptica y consolidación de la memoria.	9
Figura 5. Tipos celulares del estriado.....	14
Figura 6. Aferencias corticales y talámicas al estriado.	16
Figura 7. Representación de los circuitos estriatales directos e indirectos en un plano sagital de rata.	17
Figura 8. Sistemas de memoria del estriado.	20
Figura 9. El entrenamiento incrementado produce una alta resistencia a la extinción.	22
Figura 10. Cámara de evitación inhibitoria.	26
Figura 11. Línea temporal del procedimiento de manipulación y entrenamiento..	27
Figura 12. Regiones del estriado seleccionadas para la captura de imágenes.	30
Figura 13. Criterios de selección para el conteo celular.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 14. Entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria.	32
Figura 15. Porcentaje de núcleos c-Fos positivos en el estriado.....	33
Figura 16. Porcentaje de núcleos c-Fos positivos en regiones del estriado.	34
Figura 17. Porcentaje de núcleos c-Fos positivos en porciones del estriado.	35
Figura 18. Imágenes representativas de la porción ventral de la región lateral del estriado	36

I. INTRODUCCIÓN

Si la evolución fuera un juego, el objetivo de cada individuo sería difundir sus genes a la mayor cantidad de descendientes como sea posible (Darwin, 1859). La estrategia sería sencilla: tomar medidas que promuevan, y evitar acciones que amenacen, la propia sobrevivencia y la de sus descendientes, pero los retos son una competición feroz y un entorno siempre cambiante que rebosa de estímulos sensoriales tanto familiares como novedosos. Para ser competitivo, cada individuo debe filtrar la información, identificando si ciertas señales pueden tener un impacto positivo o negativo en su objetivo y, posteriormente, seleccionar una respuesta de comportamiento adecuada y para ganar se debe hacer esto de forma rápida y precisa (Nieh, Kim, Namburi y Tye, 2013). El aprendizaje y la memoria son dos de los muchos mecanismos por los cuales la mayoría de los animales son capaces de adaptarse al medio ya que, gracias a una compleja serie de procesos perceptivos, cognitivos y de organización motora que tienen lugar en el cerebro de cada organismo, son capaces de modificar su conducta en función de las condiciones ambientales (Tooby y Cosmides, 1990).

A través de los años se han estudiado las bases biológicas de estas modificaciones conductuales en el sistema nervioso central de modelos animales, mediante diferentes técnicas como lesiones e inactivaciones locales o mediante la expresión de genes tempranos inmediatos (IEG por sus siglas en inglés) (Sutherland, Lee, McDonald y Lehmann, 2019).

La actividad sináptica producto de experiencias conductuales conduce a alteraciones en los niveles intracelulares de segundos mensajeros, que a su vez activan diferentes cinasas y fosfatasa celulares que modulan la actividad de una amplia gama de proteínas preexistentes y factores de transcripción (ej. CREB, SRF o ATF-2) y la activación de estos factores de transcripción promueve la expresión de genes de expresión temprana (IEGs) (Guzowski, McNaughton, Barnes y Worley, 1999; Guzowski, Setlow, Wagner, y McGaugh, 2001; Herdegen y Zimmermann,

1995; Hess, Lynch, y Gall, 1995; Vann et al. 2000). Tal como el gen *c-fos* que codifica la proteína c-Fos, ésta última forma un complejo heterodimérico con otras proteínas como la 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 (Muller et al., 1983; Greenberg y Ziff, 1984; Chiu et al., 1988; Halazonetis et al., 1988; Kouzarides y Ziff, 1988). La expresión de la proteína c-Fos puede activarse por gran variedad de estímulos, como la estimulación por neurotransmisores o por despolarización e incremento de Ca^{2+} intracelular (Herdegen y Leah, 1998), razón por la cual ha sido empleado como un marcador de activación celular.

Por otro lado, en nuestro laboratorio diversos trabajos han demostrado que cuando un sujeto es sometido a un entrenamiento incrementado (es decir, cuando se incrementa la intensidad del estímulo aversivo, choque eléctrico) se produce un efecto protector contra tratamientos amnésicos (como bloqueadores de canales de sodio o antagonistas de receptores colinérgicos y GABAérgicos, así como inhibidores de la síntesis de proteínas) administrados en una región cerebral específica, como la amígdala (Salado-Castillo et al. 2011), el hipocampo (Garín-Aguilar, et al. 2014) y el estriado (Díaz del Guante et al. 1991; Prado-Alcalá y Cobos Zapiáin, 1977; Prado-Alcalá et al. 2017; Salado-Castillo et al. 1996). Por lo que la visión de que el proceso de formación de la memoria está mediado por un conjunto más o menos rígido de sistemas de moléculas y de estructuras cerebrales particulares, no es apoyada por los datos experimentales antes mencionados y, por el contrario, parece ser que es un proceso muy dinámico, que se apoya en una interacción compleja de mecanismos moleculares y cerebrales, no del todo conocidos hasta el momento. Es por ello que, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el porcentaje de células activas (mediante un marcador de activación celular, c-Fos) en la región del estriado, después de que los animales son sometidos a una experiencia de aprendizaje de evitación inhibitoria, bajo dos condiciones de entrenamiento aversivo (moderado e incrementado).

II. ANTECEDENTES

1. ASPECTOS GENERALES DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA

1.1. Aprendizaje

El aprendizaje se ha definido como un cambio relativamente permanente en la conducta como resultado de la práctica o la experiencia (Lachman, 1997). Sin embargo, observar un cambio en la conducta no es suficiente para inferir la presencia de un aprendizaje porque (1) no todos los efectos de la experiencia en la conducta pueden considerarse aprendizaje (por ejemplo, la exaltación al experimentar un estímulo inesperado como un golpe fuerte) y (2) no todos los cambios en la conducta se deben a la experiencia (también pueden deberse a fatiga, a falta de motivación o a factores genéticos) (De Houwer, Holmes-Barnes, y Moors, 2013). A pesar de que no existe una definición que goce de una aceptación universal, se ha propuesto que el aprendizaje es el proceso por el cual ocurren cambios adaptativos duraderos en los mecanismos conductuales individuales de un organismo como resultado de la experiencia previa con estímulos que generan respuestas reflejas o con otros similares (Barron et al, 2015; Domjan, 2010).

Se reconocen dos tipos básicos de aprendizaje: no asociativo y asociativo. El aprendizaje no asociativo ocurre cuando un individuo es expuesto a un estímulo aislado, por lo que el individuo aprende las características del estímulo sin asociarlo con alguna consecuencia; los principales tipos de este aprendizaje son la habituación, que consiste en una disminución en la conducta refleja del sujeto ante la presentación repetida de un estímulo débil o neutro (por ejemplo, dejar de prestar atención a los ruidos cotidianos de la calle) y la sensibilización, que consiste en un aumento en la respuesta ante un estímulo débil o neutro después de haber experimentado un estímulo intenso (por ejemplo, un animal que responde con más fuerza a un estímulo táctil leve después de recibir un pellizco doloroso) (Aguado-Aguilar, 2001). El aprendizaje asociativo ocurre cuando el cambio conductual se debe a la experiencia repetida de dos eventos que aparecen relacionados en el

tiempo y a la vez puede dividirse en condicionamiento clásico, donde el aprendizaje es causado por la asociación de dos estímulos y el condicionamiento operante que depende de la asociación entre las acciones del sujeto y el resultado de esa acción (Fanselow y Wassum, 2016). El condicionamiento clásico se produce cuando se asocian un estímulo incondicionado (EI) que provoca una respuesta refleja o incondicionada (RI) y un estímulo neutro o incondicionado (EN) que no provoca ninguna respuesta específica. Después de repetidas asociaciones, la sola presentación del EN, que ahora es denominado como estímulo condicionado (EC), adquiere la capacidad de provocar una respuesta condicionada (RC) muy semejante a la incondicionada (Domjan, 2005). Este tipo de aprendizaje fue descrito por primera vez por el fisiólogo ruso Iván Pavlov en 1927, quien usó perros como modelo experimental y observó que después de varias sesiones en las cuales se hacía sonar una campana (EN) antes de presentar un alimento (EI), que naturalmente provocaba una respuesta de salivación (RI), los perros adquirirían la capacidad de asociar el sonido de la campana con el alimento, de tal forma que cuando los perros escuchaban el sonido de la campana (EC) producían la respuesta de salivación (RC) aun y cuando ya no se les presentaba el alimento (Figura 1).

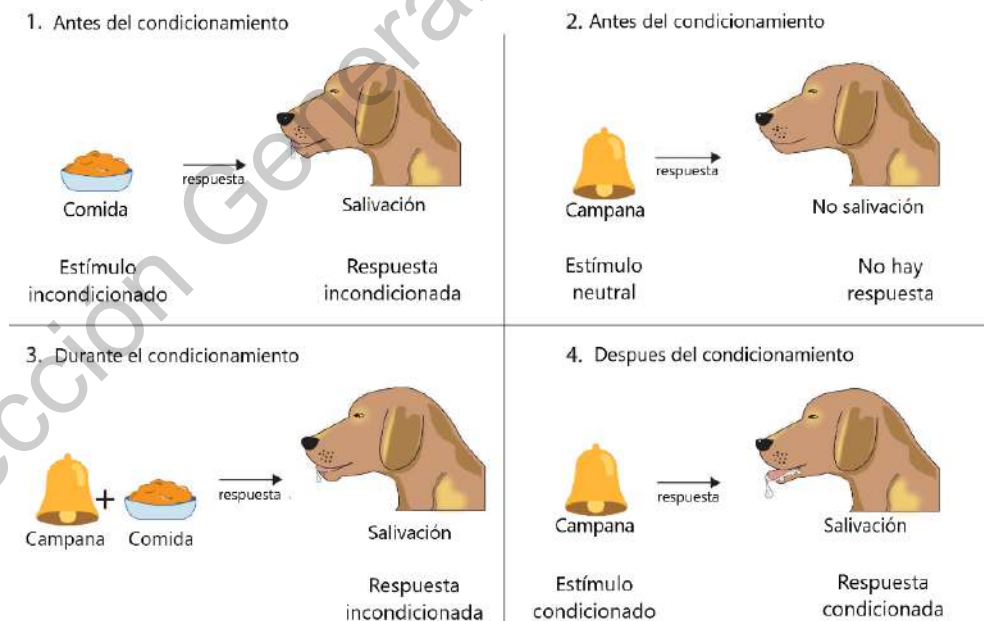


Figura 1. Condicionamiento clásico. Diagrama que muestra las fases del experimento realizado por Pavlov, para posteriormente describir el condicionamiento clásico. Modificado de Kandel (2013).

En el condicionamiento operante, el sujeto puede estar emitiendo un número indeterminado de respuestas como parte de su repertorio conductual sin ningún estímulo evocador específico, pero si a la respuesta le sigue una consecuencia positiva (reforzamiento) o negativa (castigo) entonces aumentará o disminuirá, respectivamente, la probabilidad de que la respuesta inicial se repita en el futuro (Reynolds, 1968). Un reforzamiento puede ser (1) positivo cuando la respuesta del sujeto produce una consecuencia gratificante (ej. un padre le da un dulce a su hijo cuando guarda sus juguetes) o (2) negativo cuando la respuesta termina un estímulo aversivo (ej. abrir un paraguas para no mojarse con la lluvia). En contraste, un procedimiento de castigo puede ser (1) positivo cuando la respuesta del sujeto produce un evento desagradable o aversivo (ej. una madre regaña a su hijo por correr en la calle) o (2) negativo cuando la respuesta del sujeto impide la entrega de un estímulo placentero o apetitivo (ej., si un niño no come sus verduras, la madre no le da postre) (Domjan, 2010) (Figura 2).

Reforzamiento		Castigo	
Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
La respuesta produce un estímulo gratificante	La respuesta impide la presentación de un estímulo aversivo	La respuesta produce un estímulo aversivo	La respuesta impide la presentación de un estímulo gratificante
Incremento en la tasa de respuestas		Disminución en la tasa de respuestas	

Figura 2. Condicionamiento operante. Eventos que pueden modificar la conducta. Representación basada en Domjan (2010).

1.2. Memoria

La formación de la memoria es un proceso dinámico comúnmente dividido en tres etapas: adquisición, consolidación y evocación (Szapiro et al., 2002). Durante la

adquisición, la información derivada de las experiencias de aprendizaje se mantiene en un almacén de corta duración (memoria a corto plazo) (Banai, Ortiz, Oppenheimer y Wright, 2010). En este estadio la información es lábil y susceptible a la interferencia. Si la información es consolidada pasa a un estadio estable y resistente a la interferencia (memoria a largo plazo) (McGaugh, 2000). Posteriormente la información puede ser evocada espontánea o voluntariamente mediante la reactivación del trazo de memoria formado (Figura 3) (Nadel, Hupbach, Gomez, y Newman-Smith, 2012).

Las dos principales clasificaciones de la memoria son: la memoria declarativa o explícita y la memoria no declarativa o implícita. En la memoria declarativa la información está disponible como un recuerdo consciente y se puede recordar como material verbal o no verbal, como una idea, sonido, imagen, sensación, olor o palabra. Por otro lado, la memoria no declarativa se refiere al recuerdo inconsciente de habilidades motoras (hacer un nudo), habilidades cognitivas (realizar operaciones mentales) o habilidades perceptuales (leer rápido) (Squire y Dede, 2015; Squire y Zola-Morgan, 1988).

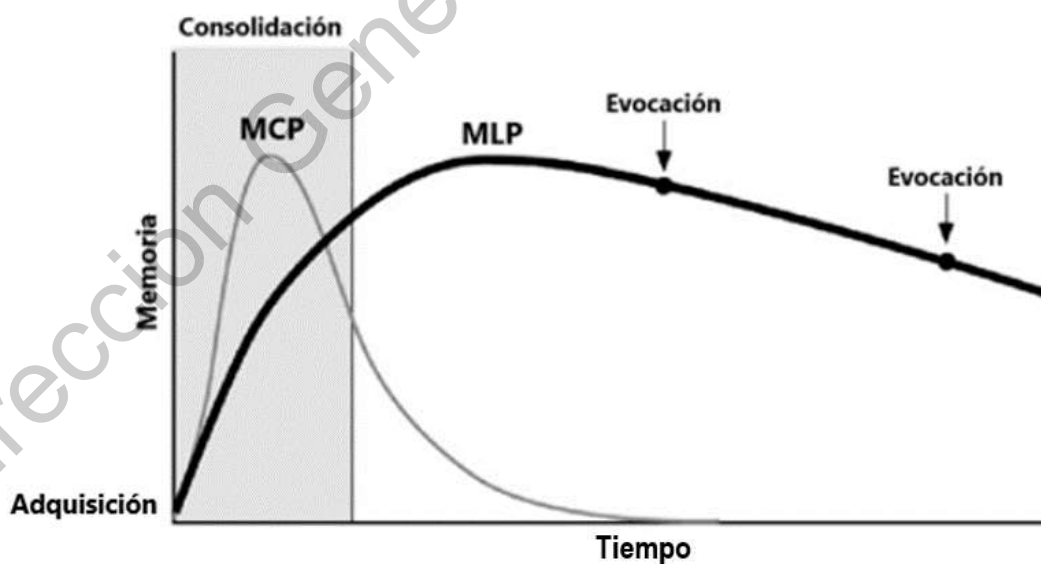


Figura 3. Modelo teórico del proceso de formación de la memoria. Se representan las 3 etapas de la formación de la memoria (adquisición, consolidación y evocación) a lo largo del tiempo. Abreviaturas; MCP, memoria de corto plazo; MLP, memoria de largo plazo. Modificado de Dudai (2004).

1.3. Consolidación de la memoria

Históricamente el concepto de consolidación se le atribuye a Müller y Pilzecker (1900) quienes lo definieron como el proceso de estabilización progresiva de la información para que la información lábil y temporal se vuelva a una memoria estable y duradera (Squire, Genzel, Wixted y Morris, 2015).

Años más tarde Donald Hebb (1949) sugirió que las experiencias están “almacenadas” en conjuntos de células neuronales que permiten que los patrones de actividad reverberen durante algún tiempo después de la adquisición y que la activación constante de estos circuitos provoca cambios estructurales duraderos en algunas regiones cerebrales que dan lugar a la formación de la memoria a largo plazo (Mayford, Siegelbaum y Kandel, 2012) y un año después Katz y Halstead (1950) propusieron que la formación de la memoria a largo plazo dependía, en parte, de la síntesis de proteínas cerebrales *de novo*, y a partir de entonces se realizaron numerosos experimentos en los que se comprobó que la administración de inhibidores de la síntesis de proteínas, tanto en forma sistémica como intracerebral, antes o inmediatamente después del entrenamiento en una tarea interfiere con la consolidación de la memoria (Davis y Squire, 1984).

Actualmente se sabe que la consolidación desencadena una serie de procesos que tienen lugar tanto durante la vigilia como durante el sueño en múltiples niveles de organización y función en el cerebro, desde el molecular hasta el conductual, y en un espectro temporal que varía de segundos a meses e incluso años (Dudai, Karni y Born, 2015).

La consolidación puede ser abordada comúnmente en dos niveles de descripción y análisis; la consolidación sináptica y de sistemas. La consolidación sináptica involucra cambios en la eficiencia sináptica y cambios morfológicos como el crecimiento axonal y formación de nuevas espinas dendríticas, producto de la regulación génica y síntesis de proteínas *de novo* (Hess, Lynch, y Gall, 1995; Kubik, Miyashita y Guzowski, 2007; Vann, Brown, Erichsen y Aggleton, 2000). Por otro

lado, la consolidación de sistemas se refiere a la reorganización poscodificación de la memoria de largo plazo (LTM) sobre circuitos neuronales distribuidos en diferentes regiones cerebrales (Dudai, 2012).

2. MARCADORES DE ACTIVACIÓN CELULAR

La actividad sináptica producto de experiencias conductuales conduce a alteraciones en los niveles intracelulares de segundos mensajeros, que a su vez activan diferentes cinasas y fosfatasa celulares que modulan la actividad de una amplia gama de proteínas preexistentes y factores de transcripción (ej. CREB, SRF o ATF-2), y la activación de estos factores de transcripción promueve la expresión de genes de expresión temprana (IEGs) (Guzowski, McNaughton, Barnes y Worley, 1999; Guzowski, Setlow, Wagner y McGaugh, 2001; Herdegen y Zimmermann, 1995; Hess, Lynch y Gall, 1995; Vann et al. 2000). Los IEGs son un conjunto de genes que se expresan en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas y, por lo tanto, no requieren síntesis de proteínas *de novo* para su expresión (Herrera y Robertson, 1996); por esta razón, tienen una ventaja temporal sobre otros genes, de allí el término "inmediato" (Aggleton, Brown y Albasser, 2012). Existe un gran número de IEGs que pueden ser clasificados en dos clases funcionales: (1) IEGs reguladores o factores de transcripción (RTFs), como *zif268*, *c-jun* y *c-fos* que pueden influir en la fisiología celular dependiendo de los genes que regulen "río abajo" (Saffen et al., 1988). (2) IEGs efectores, como *Arc* y *Homer* que pueden regular funciones celulares específicas (Brakeman et al., 1997; Guzowski et al. 2001; Lyford et al., 1995). Se ha reportado que ambas clases de IEGs desempeñan funciones importantes para el establecimiento y/o mantenimiento de cambios neuronales de larga duración y la formación de la memoria (Figura 4) (Abraham et al., 1993; Alberini, 2009; Klann y Dever, 2004; Lanahan y Worley, 1998; Okuno, 2011).

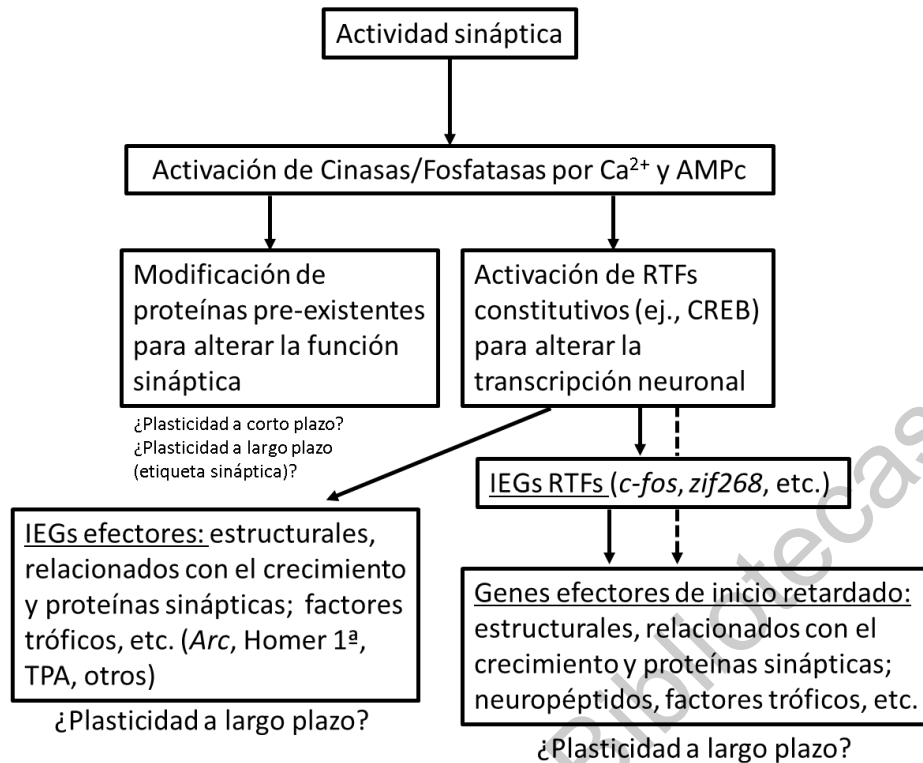


Figura 4. Modelo de expresión génica de procesos de plasticidad sináptica y consolidación de la memoria. La actividad sináptica producto de la experiencia conduce a alteraciones en los niveles intracelulares de segundos mensajeros que activan las quinasas y fosfatasa celulares. Estas enzimas modulan la actividad de una amplia gama de proteínas celulares preexistentes, incluidos los componentes sinápticos y factores de transcripción. En el núcleo, la activación de CREB y factores de transcripción relacionados inicia una cascada de expresión génica, que se requiere para la formación de la memoria a largo plazo. Modificado de Guzowski (2002).

2.1. c-Fos como marcador de activación

Los RTFs *c-fos*, *c-jun* y *zif268*, son el primer grupo de genes expresados después de la activación sináptica (Guzowski, 2002; Herrera y Robertson, 1996). En particular, c-Fos es una proteína nuclear codificada por el proto-oncogen *c-fos* (Mugnaini, Berrebi, Morgan y Curran, 1989) que se expresa en respuesta a factores de crecimiento y por la activación de receptores nicotínicos de acetilcolina y canales de calcio dependientes de voltaje (Cochran, Zullo, Verma y Stiles, 1984; Greenberg y Ziff, 1984; Greenberg, Ziff y Greene, 1986; Hoffman, Smith y Verbalis, 1993; Kruijer, Cooper, Hunter y Verma, 1984; Morgan y Curran, 1986). La expresión de la proteína c-Fos puede ser detectada por técnicas inmunohistoquímicas en el sistema nervioso central y se ha reportado que, en condiciones basales, los niveles de

RNAM de *c-fos* y los de su proteína son muy bajos (Hughes et al., 1992) y los niveles máximos detectables de la proteína ocurren entre una y tres horas posteriores al inicio del estímulo que promueven la expresión del gen, para posteriormente regresar a su línea base de forma gradual entre cuatro y seis horas después (Kovács, 1988).

La proteína c-Fos forma un complejo heterodimérico con otras proteínas como c-Jun para constituir el factor de transcripción denominado proteína activadora 1 (AP-1) que altera rápidamente la transcripción, ya sea positiva o negativamente, de una amplia variedad de genes (Morgan y Curran, 1991) entre los que se encuentran: *PENK* (pro-enkefalina), *GAD* (glutamato descarboxilasa), *TH* (tirosina hidroxilasa), *AVP* (arginina vasopresina) (Kovács, 1998) y *MMP-9* (metaloproteinasa de la matriz extracelular 9); particularmente éste último se ha reportado que es necesario para el establecimiento de modificaciones estructurales de las espinas dendríticas (Wang et al., 2008). Y también se ha reportado que la interacción de AP-1 con el factor de transcripción CREB es importante en el incremento en la fuerza sináptica y el número de sinapsis, aunque esto solo ha sido observado en moscas, (Sanyal, Sandstrom, Hoeffler y Ramaswami, 2000), pero constituyen un buen modelo de lo que podría estar ocurriendo también en otros sistemas (Gerber et al., 2014).

Tanto *c-fos* como su proteína son ampliamente utilizados como marcadores de activación neuronal, ya que proporcionan una alta resolución de célula única con baja expresión de fondo debido a su localización nuclear (Bullitt, 1990), y a pesar de que el mapeo basado en c-Fos no permite inferir posibles relaciones causales entre la activación cerebral y la conducta, como en estudios de lesiones o el seguimiento temporal de la actividad neuronal como en los registros electrofisiológicos, sí permite la localización y comparación de circuitos neuronales dentro de estructuras cerebrales específicas o de todo el cerebro a una resolución que no era posible anteriormente (Jaworski, Kalita y Knapska, 2018).

Se ha publicado una serie de resultados mostrando que la rápida expresión del gen *c-fos* y su proteína c-Fos en diversas regiones cerebrales está asociado con el establecimiento de la memoria de largo plazo de diferentes paradigmas de aprendizaje (Jaworski, Kalita y Knapska, 2018). En un estudio hecho por He et al. (2002) observaron un incremento en los niveles de la proteína c-Fos en la región de CA3 del hipocampo dorsal de ratas que fueron sometidas a una tarea de memoria espacial en un laberinto radial de ocho brazos. Por otro lado, se ha reportado que la microinyección en el hipocampo dorsal de oligos antisentido de *c-fos* (una cadena de nucleótidos corta de secuencia complementaria a un fragmento de RNAm diana, que bloquea el proceso de traducción del mensaje genético a proteína) provoca un deterioro de la memoria espacial (Guzowski, 2002; He et al., 2002) y contextual (Katche et al., 2010). Cabe mencionar que este mismo efecto de deterioro de la memoria provocado por la microinyección de oligos antisentido también se ha reportado en la amígdala para una memoria de condicionamiento aversivo al sabor (Lamprecht y Dudai, 1996) y en la corteza prefrontal para un condicionamiento de miedo al tono (Morrow, Elsworth, Inglis y Roth, 1999). Estos resultados apoyan la hipótesis de Kaczmarek (1993) quien propuso que los factores de transcripción, especialmente *c-fos*, tienen un papel muy importante en la integración de la información durante los procesos de aprendizaje y memoria. Además, numerosos estudios proponen que la expresión de *c-fos* en diferentes regiones cerebrales parece estar relacionada con la presentación de estímulos novedosos y estrés durante la adquisición de estas tareas (Cirelli y Tononi, 2000; Lin, et al. 2018; Nikolaev, Kaczmarek, Zhu, Winbland y Mohammed, 2002; Radwanska, Nikolaev, Knapska y Kaczmarek, 2002; Sotty, Sandner y Gosselin, 1996; Tulogdi et al. 2012). Sin embargo, es un tema muy difícil de abordar y se propone que probablemente no haya aprendizaje sin un componente de estrés, y de la misma manera, cada procedimiento estresante da como resultado el aprendizaje (Filipkowski et al., 2006).

Uno de los paradigmas más utilizados para estudiar los mecanismos neurobiológicos que participan en los procesos de aprendizaje y consolidación de la memoria es la tarea de evitación en sus versiones activa o inhibitoria, en las

cuales el sujeto evita un compartimento en donde anteriormente recibieron un choque eléctrico (Jarvik y Kopp, 1967; Netto y Izquierdo, 1985). En esta tarea, la presentación del estímulo aversivo resulta en un estado emocional aprendido que involucra el condicionamiento clásico Pavloviano (condicionamiento de miedo al contexto) seguido por la adquisición de las respuestas adaptativas de escape o evitación (aprendizaje operante de acción-resultado o de procedimiento) (Ogren y Stiedl, 2010).

Se ha reportado que después de una tarea de evitación activa, regiones cerebrales relacionadas a la adquisición de este tipo de tarea, como el hipocampo y la corteza visual, presentaron un aumento en los niveles de RNAm de *c-fos* una hora después del entrenamiento (Nikolaev et al., 1992a). En un estudio posterior se reportó que la expresión de *c-fos* aumenta en la corteza visual, sensorial y límbica en un estadio temprano de entrenamiento, mientras que en un estadio tardío no hubo cambios; sin embargo, después de un largo periodo de entrenamiento, la expresión de *c-fos* podía ser inducida por la introducción de un estímulo de señalización nuevo (Nikolaev et al., 1992b).

Por otro lado, la tarea de evitación inhibitoria, a diferencia de la evitación activa, se adquiere rápidamente (en un solo ensayo) y resulta en un comportamiento aprendido relativamente estable durante un período sustancial de tiempo después del entrenamiento (Gold, 1986). En este sentido, Zhang, Fukushima y Kida entrenaron ratones en una tarea de evitación inhibitoria y midieron los niveles de la proteína de *c-Fos* 90 minutos después del entrenamiento en distintas regiones cerebrales de diferentes grupos: no sometidos a ninguna experiencia, expuestos únicamente al contexto sin recibir choque o que solo recibieron el choque sin ser expuestos al contexto y observaron un aumento en los niveles de *c-Fos* en el grupo entrenado en la tarea con respecto al resto de los grupos control específicamente en la región CA1 y CA3 del hipocampo, en el núcleo lateral y basolateral de la amígdala y en la corteza prefrontal medial prelímbica e infralímbica. Estos resultados sugieren que la memoria de una tarea de evitación inhibitoria está

codificada en una amplia red de regiones cerebrales que incluyen la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala.

3. ESTRIADO

El estriado es una región subcortical conformado por los núcleos caudado, putamen y accumbens (Gerfen y Bolam, 2017). Esta estructura representa la aferencia principal de los ganglios basales (una serie de núcleos subcorticales interconectados que incluyen el globo pálido, el núcleo subtalámico y la sustancia nigra) (Goodman y Packard, 2017). Además, el estriado se ha asociado con funciones cerebrales como la motivación, la planificación motora y el aprendizaje procedimental (Packard y Knowlton, 2002; Yin y Knowlton, 2006).

3.1. Anatomía

Anatómicamente el estriado presenta una distribución celular bastante homogénea y está conformado en su mayoría por neuronas medianas espinosas (MSN, por sus siglas en inglés) que representan más del 95% de las neuronas estriatales y las neuronas estriatales restantes son varios tipos de interneuronas (Voorn, Vanderschuren, Groenewegen, Robbins y Pennartz, 2004). Además, con el uso de métodos de transporte axonal retrogrado se demostró que las MSN son el principal objetivo de entrada y la principal neurona de salida de información del cuerpo estriado, mientras que las interneuronas no presentan axones de proyección fuera del estriado, sino que distribuyen sus axones localmente, la mayoría de los cuales hacen contacto sináptico con las MSN (Grofová, 1975; Goodman y Packard, 2017).

El soma de las MSN tienen un diámetro de 12-20 μm y sus dendritas forman un campo dendrítico radial que se extiende desde el soma hasta una distancia de 100 a 250 μm (Kawaguchi, Wilson y Emson, 1990), estas neuronas son GABAérgicas y pueden dividirse en dos tipos principales con base en su expresión genética: (1) las MSN estriatonigrales que exhiben una alta expresión de receptores a dopamina D1 y receptores muscarínicos M4 y (2) las MSN estriatopalidales que exhiben una

alta expresión de receptores a dopamina D2 y receptores a adenosina A2A (Gerfen et al., 1990).

Por otro lado, las interneuronas estriatales pueden clasificarse en células medianas GABAérgicas y células colinérgicas (Kawaguchi, Wilson, Augood y Emson, 1995). Las células medianas GABAérgicas a su vez pueden diferenciarse por sus propiedades histoquímicas en: (1) células parvalbumina-positivas, (2) somatostatina-positivas, neuropéptido Y y sintetasa de óxido nítrico-positivas y (3) calretinina-positivas, o por sus propiedades fisiológicas en al menos dos clases: (1) las de disparo rápido (FS, por sus siglas en ingles) que presentan tasas de disparo rápido de manera sostenida y (2) las interneuronas de umbral bajo (LTS, por sus siglas en ingles) que tienen tasas menores de disparo; en este sentido, las células parvalbumina-positivas también pueden ser nombradas como neuronas FS mientras que las somatostatina-positivas y las calretinina-positivas como neuronas LTS (Figura 5) (Kreitzer, 2009; Tepper y Bolam, 2004).

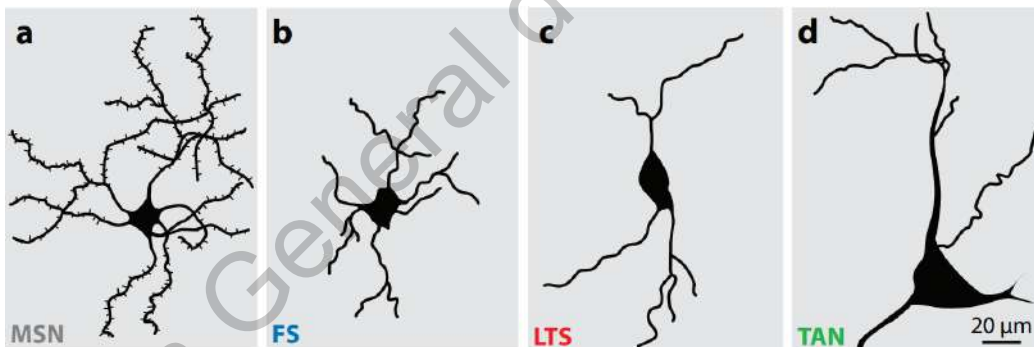


Figura 5. Tipos celulares en el estriado. Representación esquemática de (a) una neurona mediana espinosa (MSN) (b) una interneurona de disparo rápido (FS), (c) una interneurona de umbral bajo (LTS) y (d) una interneurona colinérgica tónicamente activa (TAN). Kreitzer, 2009.

A pesar de que bajo el microscopio óptico el estriado exhibe una apariencia relativamente uniforme, se ha observado que ciertos marcadores neuroquímicos etiquetan a grupos de NMEs en parches y matrices (Kreitzer, 2009) y se ha reportado que esta organización parche/matriz es importante durante el desarrollo

y segrega las NMEs en función de sus proyecciones aferentes y eferentes (Gerfen, 1992).

Los parches, también conocidos como estriosomas, representan ~10% del volumen estriatal y se distinguen por la unión densa del receptor opioide μ (Herkenham y Pert, 1981), una alta tinción de la sustancia P (Bolam, Izzo y Graybiel 1988) y una tinción deficiente para marcadores colinérgicos como la acetilcolinesterasa (Graybiel y Ragsdale, 1978). Por el contrario, la matriz está definida por una rica tinción de acetilcolinesterasa y colina acetiltransferasa (ChAT) (Graybiel, Baughman y Eckenstein, 1986; Graybiel y Ragsdale, 1978), así como inmunorreactividad para calbindina (Gerfen et al. 1985) y somatostatina (Gerfen, 1984).

3.2. Aferencias y Eferencias

Las NMEs de la región más ventromedial del estriado reciben aferencias provenientes el núcleo paraventricular de la línea media del tálamo mientras que los núcleos talámicos intralaminar posterior y lateral (asociados con funciones motoras primarias), y las cortezas somatosensoriales se proyectan hacia las NMEs de la región dorsolateral, por otro lado, los núcleos talámicos intralaminares más ventral y medialmente ubicados (que probablemente mantienen las funciones sensoriales y cognitivas polimodales) se proyectan en zonas estriatales longitudinalmente intermedias entre los dos extremos (Van der Werf, Witter y Groenewegen, 2002). Del mismo modo los núcleos amigdaloides basales caudales (asociados con funciones viscerolímbicas) se proyectan más medialmente, mientras que los núcleos del complejo amigdaloides basal rostral envían sus fibras más lateralmente en el estriado (Wright, Beijer y Groenewegen, 1996). Finalmente, la formación del hipocampo (en particular el subículo y la región CA1) se proyecta a las partes más ventrales del estriado, así como a las partes inmediatamente adyacentes del núcleo accumbens-core, mientras que las neuronas del hipocampo dorsal y ventral se proyectan lateral y medialmente, respectivamente (Figura 6) (Brog, Salyapogse, Deutch y Zahm, 1993; Groenewegen et al., 1999).

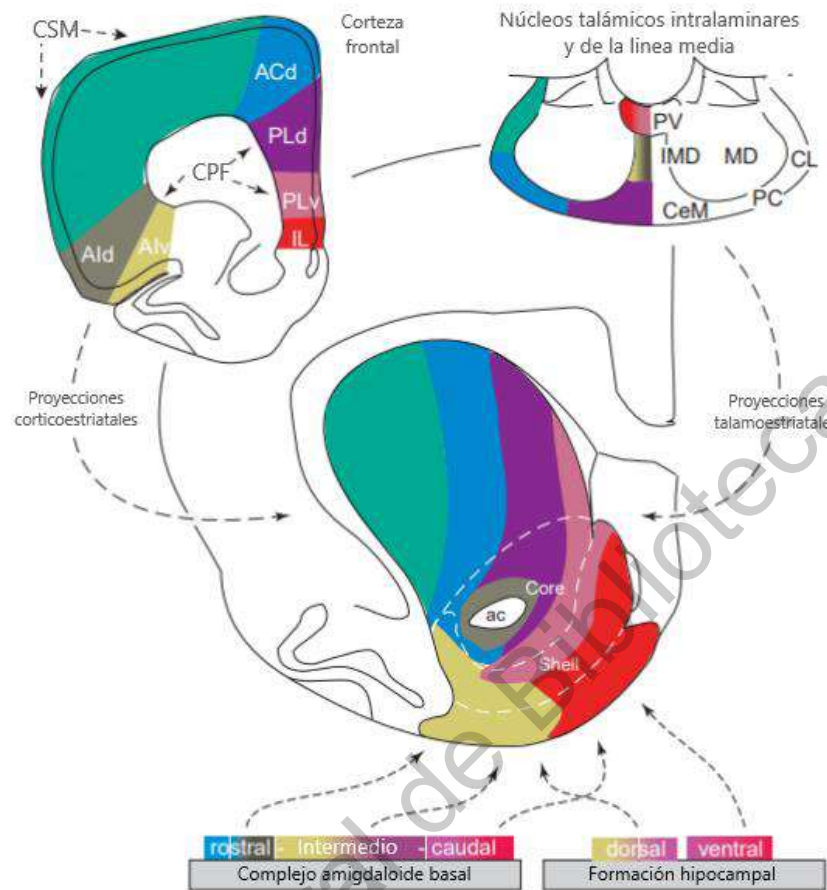


Figura 6. Aferencias corticales y talámicas al estriado. Se ilustra en un corte coronal de cerebro de rata las aferencias estriatales que se originan en la corteza frontal (superior izquierda), la línea media y los núcleos talámicos intralaminares (superior derecha), el complejo amigdaloides basal (inferior izquierda) y la formación del hipocampo (inferior derecha). El origen de las aferencias y sus correspondientes zonas de inervación estriadales se muestran en los mismos colores. Abreviaturas: ac, comisura anterior; ACd, corteza cingulada anterior dorsal; Ald, corteza insular agranular dorsal; Alv, corteza insular agranular ventral; CeM, núcleo talámico medial central; CL, núcleo talámico lateral central; IL, corteza ínfra límbica; IMD, núcleo talámico intermedio-dorsal; MD, núcleo talámico medio-dorsal; PC, núcleo talámico paracentral; PFC, corteza prefrontal; PLd, corteza pre límbica dorsal; PLv, corteza preliminar ventral; PV, núcleo talámico paraventricular; CSM, corteza sensoriomotora. Modificado de Voorn et al. (2004).

En cuanto a sus eferencias las NMEs estriatonigrales conforman la vía directa de salida del estriado y proyectan sus axones al globo pálido medial (GPM) y la sustancia nigra pars reticulata (SNr), mientras que las NMEs estriatopálidas conforman la vía indirecta de salida ya que tienen varios relevos que incluyen el núcleo subtalámico (STN), el GPM y la SNr (Fig. 5) (Gerfen et al., 1990; Kreitzer y Malenka, 2008). El efecto neto de la activación de la vía directa es la disminución

de la inhibición talámica, lo que lleva a la activación de los circuitos premotores corticales y la selección o facilitación del movimiento, mientras que la activación de la vía indirecta mantiene la inhibición de las neuronas de proyección talamocorticales, reduciendo la actividad motora (Figura 7) (Fuccillo, 2016; Kreitzer y Malenka, 2008).

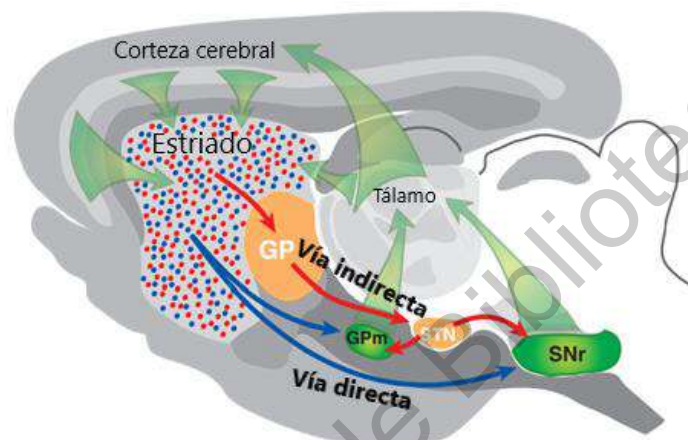


Figura 7. Representación de los circuitos estriatales directos e indirectos en un plano sagital de rata. La corteza cerebral y el tálamo proporcionan entradas excitatorias (flechas verdes) al estriado. La salida de los ganglios basales se origina en el globo pálido medial (GPm) y la sustancia nigra pars reticulata (SNr) y se dirige principalmente a los núcleos talámicos, que se proyectan a las áreas frontales de la corteza cerebral. La vía directa se origina en las MSNs estriatonigrales (azul) cuyos axones (flechas azules oscuras) se extienden directamente a los núcleos de salida GPm y SNr. La vía indirecta se origina en las MSNs estriatopalidales (rojas) cuyos axones se proyectan hacia el globo pálido (GP). Las neuronas en el GP, a su vez, se proyectan hacia el núcleo subtalámico (STN), que se proyecta hacia el GPm y el SNr. Modificado de Gerfen (2006).

4. PARTICIPACIÓN DEL ESTRIADO EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA MEMORIA DE LARGO PLAZO

Se ha propuesto que además de la amígdala (Salado-Castillo et al., 2011; Martínez-Moreno, 2013) y el hipocampo (Salado-Castillo et al., 2011, Garín-Aguilar et al., 2014), el estriado también podría estar participando en la consolidación de la memoria de una tarea de evitación inhibitoria (Prado-Alcalá, 1995; Prado-Alcalá et al., 2012), ya que ciertos estudios han demostrado que el bloqueo de canales de calcio dependientes de voltaje (inhibiendo la producción de potenciales de acción)

a través de la administración de lidocaína en el estriado después del entrenamiento en esta tarea interrumpe la formación de la memoria (Pérez-Ruiz y Prado-Alcalá, 1989; Salado-Castillo et al., 2011), y un efecto similar ha sido observado al administrar en la misma región una gran variedad de fármacos, tales como inhibidores de la transcripción (5,6-Dicloro-1- β -D-ribofuranosilbenzimidazol o DRB) o traducción (anisomicina) (Prado-Alcalá et al., 2017), así como bloqueadores selectivos de receptores a acetilcolina como la atropina (Giordano y Prado-Alcalá, 1986; Prado-Alcalá y Cobos-Zapíaín, 1977) o la escopolamina (Díaz del Guante et al., 1991) y antagonistas de receptores GABAérgicos como la picrotoxina (Salado-Castillo et al., 1996).

Por otro lado, otros estudios de lesiones han reportado una disociación funcional del estriado. En tareas operantes en las que el sujeto aprende a presionar una palanca que da como resultado la entrega de recompensa alimenticia (Balleine y O'Doherty, 2010; Burton, Nakamura y Roesch, 2014; Goodman y Packard, 2017), se ha observado que la lesión del estriado dorsolateral (EDL) interrumpe la formación de hábitos que depende de la asociación entre un estímulo (ej. una luz) con una respuesta (ej. presionar la palanca) (estímulo-respuesta) (Yin, Knowlton y Balleine, 2004, 2006), mientras que las lesiones del estriado dorsomedial (EDM) interrumpen la adquisición y expresión de conductas que dependen de la asociación entre la acción de presionar la palanca con la entrega de alimento como resultado (acción-resultado) (Yin, Ostlund, Knowlton y Balleine, 2005).

Además, estudios donde se midió la actividad neuronal por medio de los niveles de CREB fosforilado (pCREB), c-Fos y c-Jun en ratas entrenadas en una tarea de laberinto radial de 8 brazos o acuático, que podrían resolverse mediante una estrategia espacial dependiente del hipocampo o una estrategia estímulo-respuesta (E-R) dependiente del estriado, se observó que los sujetos que desarrollaron una memoria espacial presentaron altos niveles de pCREB, c-Fos y c-Jun después de la adquisición en el hipocampo, mientras que en los sujetos que desarrollaron una estrategia de respuesta se observaron altos niveles de pCREB y c-Jun en el

estriado dorsal (Colombo, Brightwell y Countryman, 2003; Teather, Packard, Smith, Ellis-Behnke y Bazan, 2005). Sin embargo, también se ha reportado que lesiones en el EDM, y no en el hipocampo, interrumpen la formación de la memoria de tareas espaciales más complejas (ej. laberinto en T de 14 brazos) ya que esta región parece jugar un papel importante en el procesamiento de la información espacial egocéntrica específica (secuencia de respuestas izquierda/derecha) (Pistell et al., 2009).

Por otro lado, en tareas operantes motivadas aversivamente se ha reportado la participación de ambas regiones, ya que al entrenar a ratas en una tarea de evitación activa de dos vías señalizada (en la cual un tono predice un choque eléctrico en las patas) a las que se lesionó de manera bilateral con ácido quinilínico el núcleo accumbens core (NAc-co), el EDM o el EDL, se observó que las ratas con lesiones en el NAc-co y el EDL aprendieron la tarea más lento que el grupo control durante las primeras sesiones de entrenamiento; sin embargo, en las últimas sesiones lograron un desempeño igual al de las ratas control, mientras que las ratas lesionadas en el EDM, a pesar de que en las primeras sesiones de entrenamiento no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control, se observó un menor desempeño en el número de respuestas de evitación en los últimos ensayos (Wendler et al., 2014).

Finalmente, a pesar de que ambas regiones pueden participar en la adquisición y expresión de estrategias instrumentales, el EDL participa principalmente en asociaciones estímulo-respuesta, mientras que el EDM puede incorporar los componentes espaciales y motivacionales para una estrategia conductual más flexible (Figura 8) (Corbit et al., 2013; Yin et al., 2005).

El núcleo accumbens (NAc), que corresponde a la región ventral del estriado, participa en la formación de la memoria de tareas de condicionamiento Pavloviano (Cardinal, Parkinson, Hall y Everitt, 2002) y de procedimiento (Corbit, Muir y Balleine, 2001) desempeñando un papel importante en la asignación de valores

motivacionales a ciertos estímulos gratificantes y aversivos presentes en las tareas conductuales (Mannella, Gurney y Baldassarre, 2013).

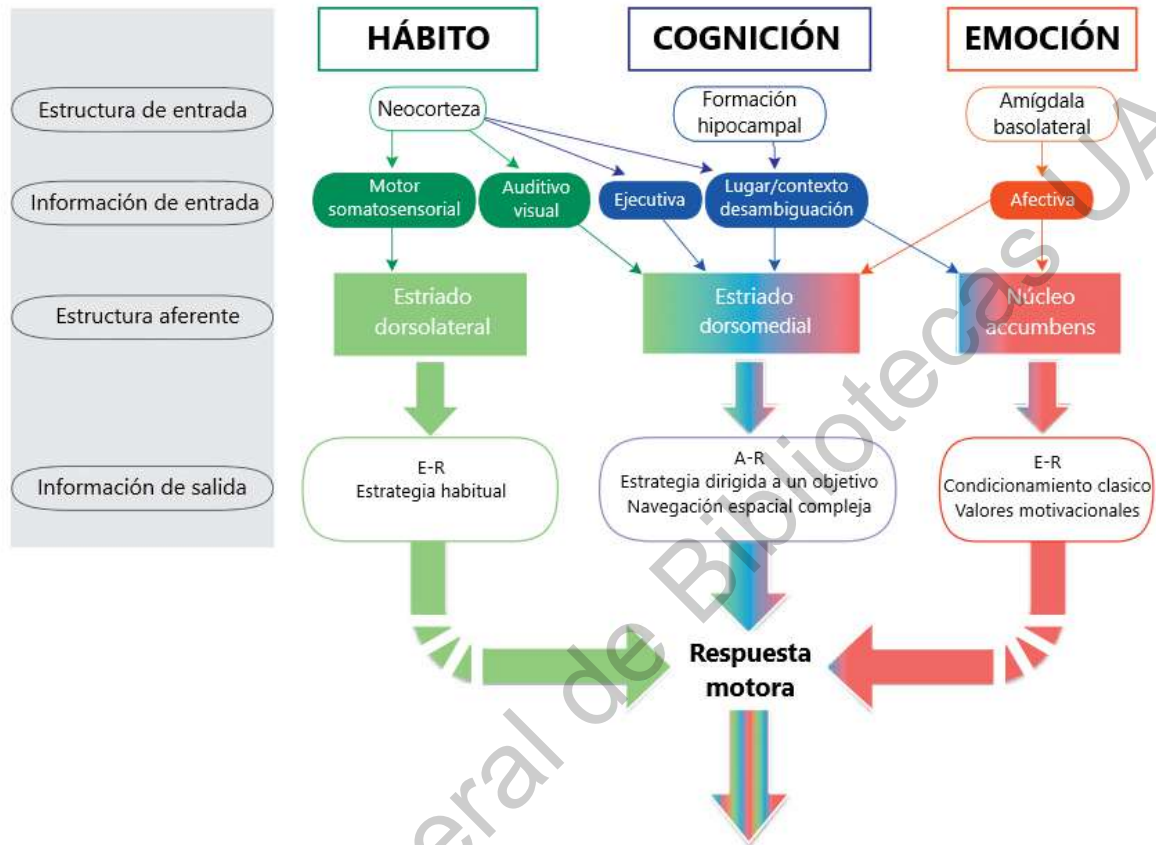


Figura 8. Sistemas de memoria del estriado. Diagrama donde se muestra de manera general los circuitos estriatales que participan en tres sistemas de aprendizaje y memoria anatómicamente distintos. E-R; estímulo-respuesta, A-R; Acción-resultado. Modificado de Goodman y Packard (2017).

5. EFECTO DEL ENTRENAMIENTO AVERSIVO INCREMENTADO

La hipótesis de que la consolidación es un proceso por el cual la información lábil pasa a un estadio estable y resistente a las interrupciones ha sido apoyada por un gran número de experimentos en los que sujetos entrenados en diferentes tareas y la subsecuente administración de tratamientos amnésicos producen una deficiencia significativa en la consolidación de la memoria; sin embargo, se ha demostrado que al incrementar la intensidad del estímulo aversivo durante la sesión de entrenamiento (entrenamiento incrementado) en una tarea de evitación inhibitoria

se protege a la memoria contra tratamientos que comúnmente producen amnesia y los sujetos son capaces de recordar muy bien la tarea (Prado-Alcala et al. 2006, 2012). Tales tratamientos incluyen la administración sistémica de fármacos que bloqueen el sistema colinérgico (Cruz-Morales et al., 1992; Díaz del Guante et al., 1991; Durán-Arévalo et al., 1990; Prado-Alcalá y Cobos-Zapiaín, 1977; Quirarte, Cruz-Morales, Díaz del Guante, García y Prado-Alcalá, 1993) y serotoninérgico (Solana-Figueroa, Salado-Castillo, Quirarte, Galindo y Prado-Alcalá, 2002), así como la administración de fármacos que producen inactivación reversible de regiones cerebrales discretas como el estriado (Prado-Alcalá et al., 2017; Salado-Castillo et al., 2011). Por ejemplo, Pérez-Ruiz y Prado-Alcalá (1989) demostraron que la infusión de lidocaína (bloqueador de los canales de sodio) en el estriado dorsal de ratas, inmediatamente después de ser entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria produce amnesia; sin embargo, la administración de un estímulo aversivo de mayor intensidad durante el entrenamiento a sujetos a los que se les infundió en el estriado el mismo tratamiento de lidocaína son capaces de recordar muy bien la tarea y un efecto similar ha sido reportado ante la infusión de atropina (antagonista de receptores colinérgicos) (Giordano y Prado-Alcalá, 1986) y anisomicina (inhibidor de la síntesis de proteínas) (Gonzales-Franco et al., 2019) en esta misma región.

Cabe destacar que este efecto protector en el estriado ante tratamientos amnésicos también ha sido observado pese a la alteración de la activada normal de otras estructuras cerebrales tales como la sustancia nigra (Cobos-Zapiaín et al., 1996), la amígdala (Martínez, 2013; Salado-Castillo et al., 2011) y el hipocampo (Garín-Aguilar, Medina, Quirarte, McGaugh y Prado-Alcalá, 2014; Salado-Castillo et al., 2011).

Además del efecto protector de la memoria antes mencionado, se ha reportado que sujetos entrenados con un estímulo aversivo más intenso en la tarea de evitación inhibitoria muestran una alta resistencia a la extinción (una disminución progresiva en la magnitud de la respuesta condicionada en ausencia del estímulo

incondicionado) en comparación con sujetos entrenados con un estímulo aversivo más bajo (entrenamiento moderado) (Figura 9) (Garín-Aguilar et al., 2012; Bello-Medina et al., 2016).

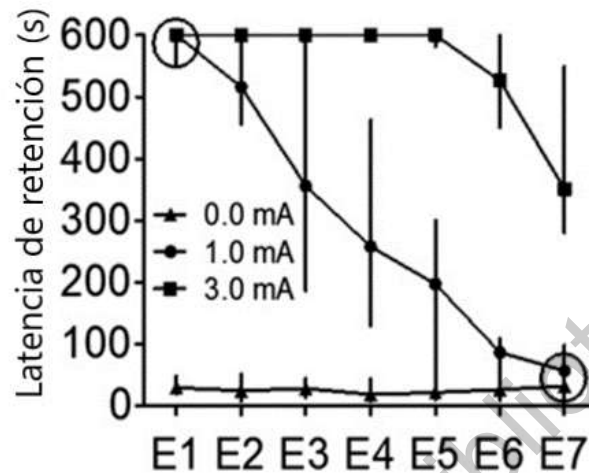


Figura 9. El entrenamiento incrementado produce una alta resistencia a la extinción. Grafica que muestra la media de las latencias de retención en segundos a lo largo de 7 sesiones de extinción diarias de grupos entrenados en la tarea de evitación inhibitoria con 0.0, 1.0 y 3.0 mA. En cada sesión de extinción, los puntajes de retención de cada grupo difieren significativamente de los puntajes de latencia de los otros grupos, a excepción de los dos puntos dentro de los círculos abiertos. Modificado de Bello-Medina et al. 2016.

Hasta el momento sigue siendo poco lo que se conoce sobre el entrenamiento incrementado y a continuación mencionaré un par de trabajos en donde se ha estudiado la neurobiología de dicho fenómeno específicamente en el estriado.

Bello-Medina et al. (2016) reportaron un aumento en la densidad de espinas dendríticas de tipo hongo, que se han relacionado con procesos de memoria (Kasai, Matsuzaki, Noguchi, Yasumatsu y Nakahara), en las neuronas medianas espinosas (NMEs) del EDM, pero no en el EDL, 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 cual 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.

En un estudio hecho por González-Franco et al. (2017) en el que se determinaron los niveles de la proteína Arc (proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad), que se ha visto involucrada en procesos de aprendizaje y memoria (Guzowski, 2002; Lyford et al., 1995), en diferentes regiones del estriado dorsal de ratas, 45 minutos después de ser entrenadas en una tarea de evitación inhibitoria con diferentes intensidades de choque eléctrico, observaron un aumento significativo en los niveles de esta proteína en la región ventral del estriado en los animales que fueron entrenados con la intensidad de choque eléctrico más alta en comparación con el grupo entrenado con las intensidad más baja. En conclusión, los autores sugirieren que este aumento en los niveles se debe 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.

III. JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó anteriormente, el proceso de formación de la memoria depende de modificaciones en la plasticidad sináptica a través de la modulación de la expresión génica. Es por ello que determinar la expresión de los productos de ciertos IEGs, como c-Fos, nos ayudaría a visualizar qué regiones cerebrales son activadas después de una experiencia de aprendizaje. La activación neuronal ha sido ya estudiada en condiciones de entrenamiento incrementado y moderado mediante la expresión de Arc en el estriado. Sin embargo, Arc es una proteína efectora que regula directamente la plasticidad sináptica, pero la expresión de una proteína reguladora de la transcripción como lo es c-Fos, que también ha sido relacionada con la formación de la memoria, no ha sido aún explorada en el estriado, en condiciones de aprendizaje incrementado.

Así pues, los resultados de esta investigación representan una primera aproximación acerca de la expresión de la proteína c-Fos en diferentes regiones del

estriado y su posible relación con la formación de la memoria cuando la experiencia aversiva es intensa.

VI. HIPÓTESIS

- 1) La expresión de la proteína c-Fos en el estriado será mayor en los animales entrenados en la tarea de evitación inhibitoria que en los no entrenados.
- 2) La expresión de la proteína c-Fos en el estriado será mayor en la condición de entrenamiento incrementado con respecto al entrenamiento moderado.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de la proteína c-Fos en el estriado de ratas entrenadas con diferentes intensidades de choque eléctrico en la tarea de evitación inhibitoria.

V. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Entrenar a ratas macho bajo condiciones de entrenamiento aversivo moderado (1.0 mA) e incrementado (3.0 mA) en una tarea de evitación inhibitoria.

Cuantificar células c-Fos positivas y c-Fos negativas en el estriado de ratas sometidas a condiciones de entrenamiento aversivo moderado (1.0 mA) e incrementado (3.0 mA).

VII. METODOLOGIA

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con los lineamientos bioéticos del Instituto de Neurobiología en la Universidad Nacional Autónoma de México para el uso de animales experimentales, bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

1. Animales

Se usaron 30 ratas macho de la cepa Wistar de entre 250 y 350 g de peso, las cuales ingresaron al bioterio del laboratorio una semana antes de comenzar el entrenamiento y se mantuvieron individualmente en cajas de acrílico (24 x 21 x 45 cm) con una cama de aserrín, en condiciones de bioterio que incluyen un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 iniciando el periodo de luz a las 7:00 am, temperatura regulada de 24 ± 1 °C y con acceso libre a agua y alimento. Los experimentos conductuales se llevaron a cabo durante la fase de luz del ciclo, entre las 8:00 am y las 2:00 pm.

En tres días consecutivos antes de las pruebas conductuales cada animal fue manipulado, colocándolo sobre una toalla en las piernas del experimentador al mismo tiempo que se sujetó y se manipuló con ambas manos durante 3 a 5 minutos por día. Este procedimiento tuvo como finalidad evitar que el animal se sobresaltara al ser manipulado durante la sesión de entrenamiento, disminuyendo así posibles conductas asociadas al estrés que pudieran interactuar con los tratamientos que se aplicaron (diferentes intensidades de choque eléctrico).

2. Tarea de evitación inhibitoria

2.1. Aparatos

Para el entrenamiento se usó una caja de evitación inhibitoria (Figura 10), la cual está hecha de acrílico rojo y dividida en dos compartimentos (A y B) separados por una puerta tipo guillotina. El compartimento A, denominado compartimento de seguridad está constituido por un piso de tubos de acero inoxidable y se encuentra iluminado por un foco incandescente de 10W, localizado en el centro de la tapa. Por otro lado, el compartimento B, o compartimento de castigo, no se encuentra iluminado y está constituido por dos placas de acero inoxidable en forma de V, que pueden ser electrificadas por un estimulador de pulsos cuadrados, conectado en serie con una unidad de corriente constante (C).

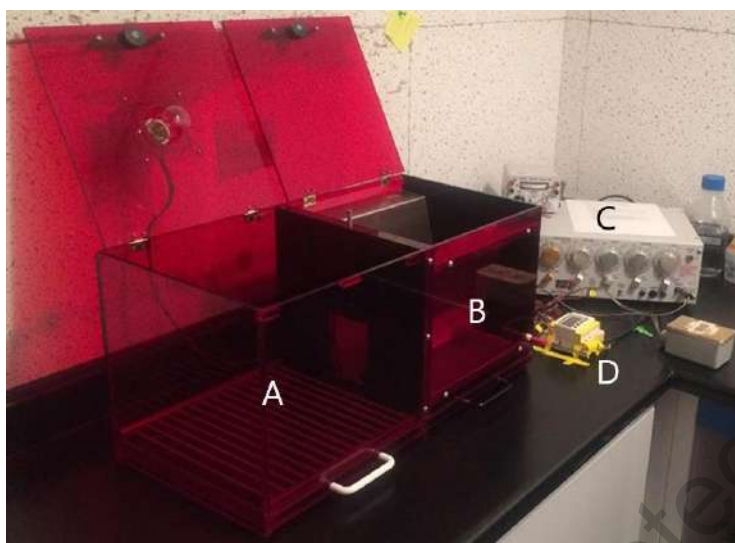


Figura 10. Cámara de evitación inhibitoria. (A) Compartimento iluminado o de seguridad, (B) compartimento oscuro o de castigo, (C) Estimulador, (D) Cronometro automatizado.

2.2. Entrenamiento

El día del entrenamiento cada animal se colocó en el interior del compartimento de seguridad de la cámara y 10 segundos después la puerta que divide los dos compartimentos se abrió y se midió la latencia para cruzar al compartimento de castigo (latencia de entrada). Cuando los animales cruzaron a este compartimento la puerta se cerró y se administró un choque eléctrico de 1.0 mA o 3.0 mA, los choques eléctricos fueron administrados en forma de un tren de pulsos cuadrados de corriente de 50 milisegundos de duración, una frecuencia de 10 Hz y una duración de tren de 10 s. Cinco segundos después del inicio del choque la puerta fue reabierta permitiendo al animal escapar al compartimento seguro, y en ese momento se apagó el estimulador; esta latencia también fue medida (latencia de escape). Después de 30 segundos en el compartimento de seguridad los animales fueron regresados a su caja habitación (Figura 11). Una vez concluido el entrenamiento de cada sujeto se limpiaron ambos compartimentos con alcohol al 10%.

2.3. Grupos experimentales y controles

Se entrenó un grupo de animales experimentales con 1.0 mA y otro con 3.0 mA, en la forma antes mencionada; además se incluyeron tres grupos control, de los cuales a un grupo de animales se le sometió a la tarea de evitación inhibitoria pero sin exponerlo al choque eléctrico (0.0 mA) con el fin de tener un grupo únicamente expuesto al contexto; al segundo se le administró un choque eléctrico de 3.0 mA en el compartimento oscuro (Solo choque, Sch 3.0 mA) sin ser sometidos a la prueba de entrenamiento (la duración del tiempo fue el promedio de choque que recibió el grupo experimental de 3.0 mA) y el tercer grupo fue mantenido en condiciones de bioterio hasta su sacrificio (Bio). La Figura 11 muestra el cronograma del experimento.

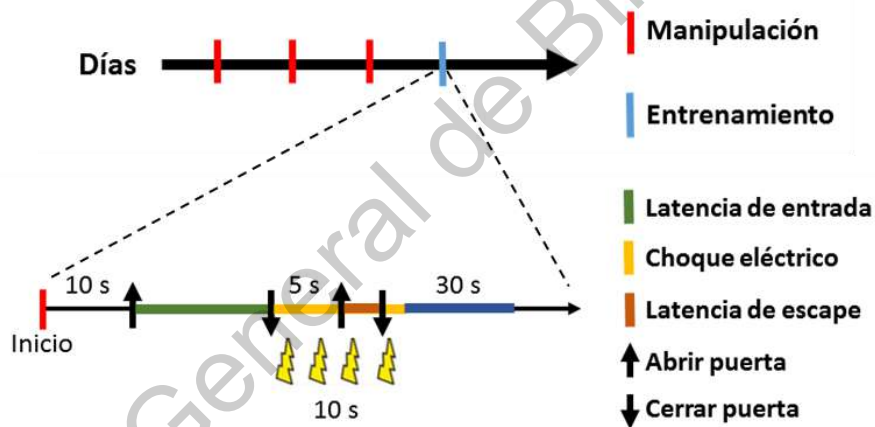


Figura 11. Línea temporal del procedimiento de manipulación y entrenamiento. Previo al entrenamiento las ratas fueron manipuladas por tres días consecutivos en una sesión de 3 a 5 minutos diarios. Un día después de la última sesión de manipulación las ratas fueron entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria, se midió la latencia de entrada (línea verde, el tiempo que la rata tardó en entrar al compartimento de castigo) y la latencia de escape (línea naranja, el tiempo que la rata tardó en escapar al compartimento seguro 5 segundos después de recibir el choque eléctrico de 1.0 mA o 3.0 mA, línea amarilla,). Las fechas hacia arriba indican apertura de la puerta tipo guillotina que separa el compartimento de seguridad del compartimento de castigo y las flechas hacia abajo indican el cierre de la misma.

3. Análisis histológico

Noventa minutos después de la sesión de entrenamiento o el procedimiento conductual correspondiente a cada grupo, los sujetos de cada grupo fueron anestesiados con pentobarbital sódico. Una vez anestesiados, los animales fueron perfundidos con paraformaldehído al 4 %. Los cerebros fueron extraídos y post-fijados por 3 horas; pasado este tiempo se transfirieron a sacarosa al 15% y permanecieron ahí toda la noche a 4 °C y al día siguiente se transfirieron a sacarosa al 30%.

3.1. Inmunohistoquímica de fluorescencia

Para el análisis histológico se seleccionaron cuatro cortes coronales (30 μ m de grosor) por cada cerebro en un eje anteroposterior dentro de las coordenadas +1.08 - 0.84 mm con respecto a Bregma de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (2007). Los cortes fueron cortados coronalmente con un criostato y almacenados a -20 °C en una solución de anticongelante hasta su posterior procesamiento con la inmunohistoquímica de fluorescencia. Los cortes fueron lavados en PBS y posteriormente fueron tratados con peróxido al 3%, seguido por borhidrato de sodio al 1% y posteriormente incubado en solución de bloqueo, que contenía suero normal de cabra (NGS) al 5% (Jackson ImmunoResearch), tritón X-100 al 1% (Merck) disuelto en buffer de caseína (TSA fluorescein kit, PerkinElmer) por 1 hora. Los cortes fueron incubados durante 48 horas con un anticuerpo primario policlonal de c-Fos (1:2000; abcam); y después con un anticuerpo secundario biotinilado por 1 hora a temperatura ambiente, la señal fue amplificada por lo que se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en complejo ABC (Vectastain). La tinción se visualizó usando FITC (TSA fluorescein kit, PerkinElmer) y los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (Sigma-Aldrich).

Los cortes se montaron en ciego (a excepción del grupo BIO) en laminillas gelatinizadas de tal forma que cada laminilla incluyera un corte de cada uno de los 6 diferentes grupos experimentales y posteriormente se cubrieron con medio de montaje vectashield para prevenir el fotoblanqueo.

3.2. Captura de imágenes

Las estructuras fueron anatómicamente definidas de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (2007). Por cada sujeto se analizaron cuatro cortes de los cuales se tomaron cuatro imágenes por hemisferio; una de la porción dorsomedial (DM), otra de la porción dorsolateral (DL), una más de la porción ventromedial (VM) y una última de la porción ventrolateral (VL) del estriado (Figura 12).

Estas imágenes se obtuvieron por medio de un microscopio semiconfocal de fluorescencia Apotome (Carl Zeiss Imager Z1), con una cámara AxioCamMR3 y el software AxioVision 4.8 con la cual se tomaron fotografías de la señal de c-Fos y de la contratinción de DAPI (para núcleos) con un objetivo de 40x en el plano Z (en profundidad) con un rango de 25 a 35 planos por imagen, con una distancia de 1 μm entre cada plano. Los parámetros para la captura de imágenes en el microscopio se definieron en cada laminilla utilizando un animal control (Bio) como referencia del tiempo de exposición que se aplicaría de manera estable para la captura del resto de las imágenes en la misma laminilla.

Las imágenes obtenidas se analizaron por medio de software imageJ. A partir del plano medio de cada una de las imágenes en Z se tomó solo el 60% (30% hacia arriba y 30% hacia abajo del plano medio) para la cuantificación de los núcleos celulares. Para el análisis de la proteína c-Fos, las células se clasificaron en células positivas y negativas (Figura 13). Se consideraron como células positivas aquellas en donde la señal de c-Fos abarcaba alrededor del 50% o más del núcleo y se mantenía en al menos tres planos de la imagen. Los resultados fueron expresados en porcentaje de células positivas (el cual fue obtenido dividiendo el número de núcleos positivos a c-Fos entre el total de núcleos multiplicado por cien).

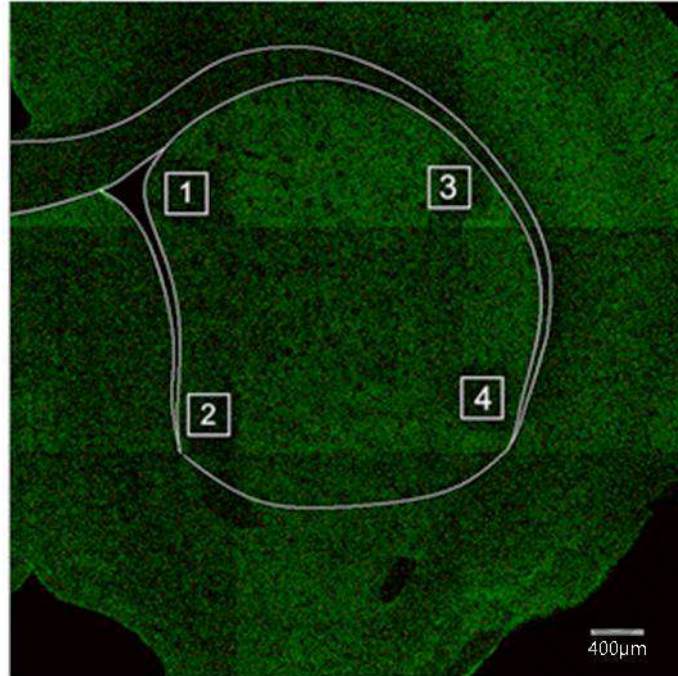


Figura 12. Captura de imágenes. Mosaico del estriado que muestra los núcleos celulares teñidos con DAPI (verde) y las regiones del estriado seleccionadas para la captura de imágenes. Las regiones numeradas corresponden a: 1) porción dorsomedial (DM), 2) porción ventromedial (VM), 3) porción dorsolateral (DL) y 4) porción ventrolateral (VL). Las capturas en los sitios 1 y 2 corresponden a la región medial, las del 3 y 4) a la región lateral, mientras que las de los sitios 1 y 3 a la región dorsal, y las del 2 y 4) a la región ventral. Bregma 0.96 mm.

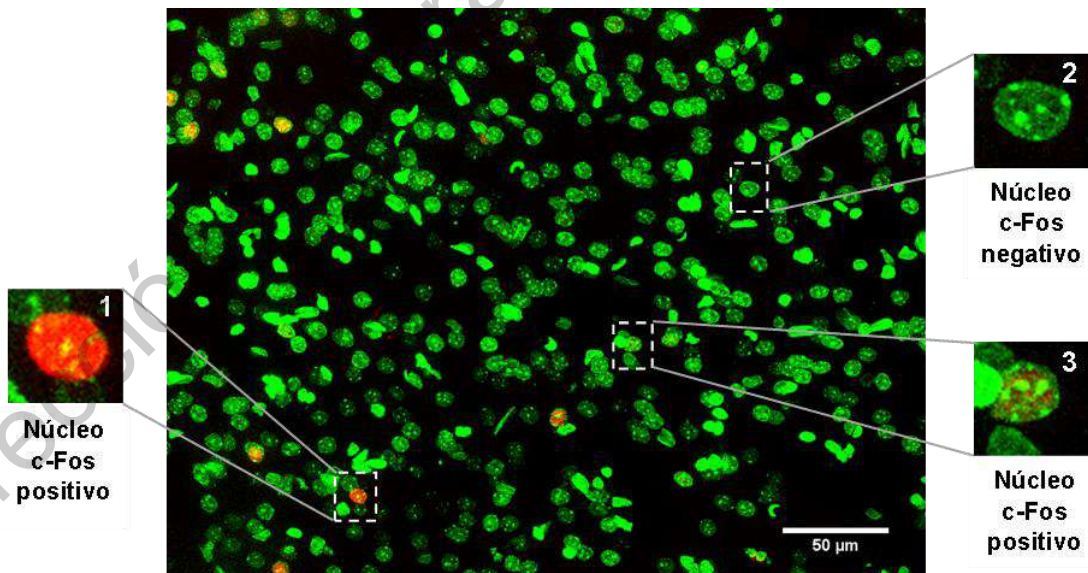


Figura 13. Criterios de selección para el conteo celular. Se muestra una reconstrucción de una imagen en Z de los núcleos celulares teñidos con DAPI (verde) y la proteína c-Fos (rojo). Se ejemplifica un núcleo c-Fos positivo (1) y negativo (2), así como la expresión mínima considerada como un núcleo c-Fos positivo (3).

4. Análisis estadístico

4.1. Conductual

Para comparar las latencias de entrada y de escape entre los grupos entrenados con 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA se utilizó la prueba Kruskal-Wallis y en caso de encontrar diferencias significativas se utilizó una prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

4.2. Histológico

Los datos obtenidos en el análisis histológico (porcentaje de células positivas a c-Fos) se analizaron mediante una prueba de Kruskal-Wallis y en caso de encontrar diferencias significativas entre los tratamientos, las comparaciones post-hoc se realizaron mediante la prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

VIII. RESULTADOS

1. Tarea de evitación inhibitoria

Durante el entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria se registró tanto la latencia de entrada como la latencia de escape de los grupos entrenados con 0.0, mA, 1.0 y 3.0 mA. Al comparar las latencias de entrada al compartimento oscuro de estos tres grupos no se encontraron diferencias significativas ($H_{(2)} = 4.819$, $p = 0.0857$) (Figura 14 A). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en las latencias de escape ($H_{(2)} = 12.04$, $p < 0.0002$) y la prueba de comparación múltiple de Dunn mostro que el grupo de 0.0 mA tuvo latencias de escape significativamente más altas que las de los grupos entrenados con 1.0 mA y 3.0 mA ($p = 0.035$ y $p = 0.0026$, respectivamente), no encontrándose diferencias entre los dos últimos grupos ($p = 0.9999$) (Figura 14 B).

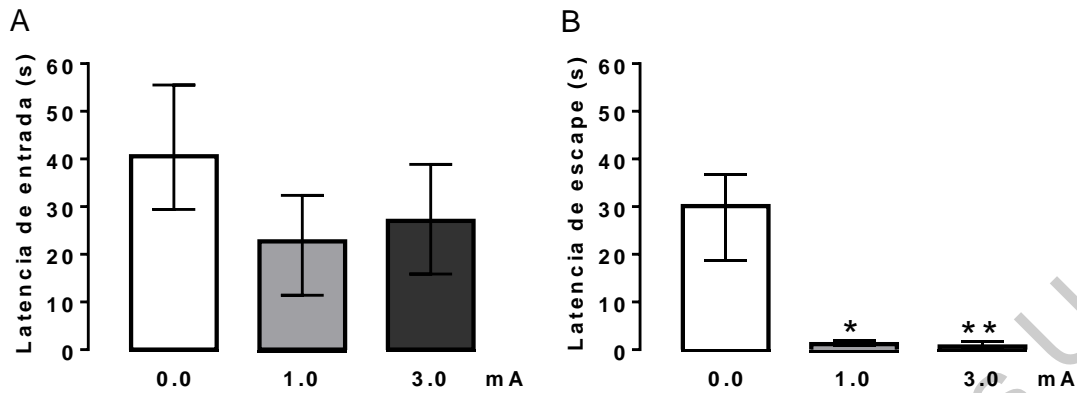


Figura 14. Entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria. A) Gráfica con valores de las medianas con sus rangos intercuartilares de la latencia de entrada en segundos de los grupos entrenados con 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA en la tarea de evitación inhibitoria. B) Gráfica con valores de las medianas con sus rangos intercuartilares de la latencia de escape en segundos de los grupos antes mencionados. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$ vs el grupo 0.0 mA.

2. Efecto del entrenamiento moderado e incrementado sobre la expresión de la proteína c-Fos

Para determinar una posible diferencia en el porcentaje de núcleos c-Fos positivos totales de los diferentes grupos experimentales se calculó el porcentaje de los núcleos c-Fos positivos conjuntando las cuatro regiones. El análisis de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas ($H_{(5)} = 9.548$, $p = 0.0488$) y el análisis post-hoc reveló diferencias significativas entre el grupo entrenado con 3.0 mA vs el grupo Bio ($p = 0.0257$); sin embargo, no hubo diferencias del grupo entrenado con 3.0 mA vs los grupos de Sch 3.0 mA ($p > 0.9999$), 0.0 mA ($p > 0.9999$) y 1.0 mA ($p > 0.9999$) (Figura 15).

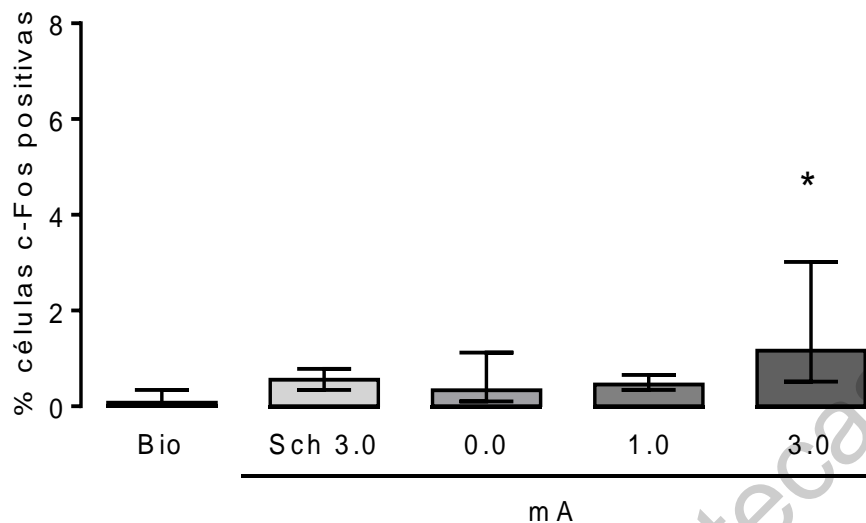


Figura 15. Porcentaje de células c-Fos positivas en el estriado. Gráfico que muestra la mediana del porcentaje de células positivas a c-Fos con rangos intercuartiles de los grupos: Bioterio (Bio), solo choque de 3.0 mA (Sch 3.0) y los entrenados con 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA. * $p < 0.05$ comparado con el grupo Bio.

Regionalización del estriado

Debido a que se ha reportado una disociación funcional del estriado, en la que la región lateral participa en la formación de hábitos que depende de la asociación estímulo-respuesta (Yin, Knowlton y Balleine, 2004, 2006), mientras que la región medial en conductas que dependen de la asociación acción-resultado (Yin, Ostlund, Knowlton y Balleine, 2005), se analizaron los porcentajes de núcleos c-Fos positivos de la región medial (DM) y lateral (DL) del estriado. El análisis no mostró diferencias significativas para la región medial ($H_{(5)} = 7.504$, $p = 0.1115$) ni para la región lateral ($H_{(5)} = 8.988$, $p = 0.0614$) del estriado (Figura 16 A y B).

Por otro lado, debido a que se ha observado un aumento significativo en los niveles de la proteína Arc en la región ventral del estriado, pero no en la porción dorsal, en los animales que fueron entrenados con las intensidades de choque eléctrico más altas comparados con el grupo entrenado con una intensidad baja de choque (González-Franco et al., 2017) decidimos analizar el porcentaje de núcleos c-Fos

positivos de la región dorsal y ventral del estriado. El análisis no mostró diferencias significativas para la región dorsal ($H_{(5)} = 7.737$, $p = 0.1017$) pero si para la región ventral ($H_{(5)} = 9.777$, $p = 0.0444$) del estriado y el analisis post-hoc mostró diferencias significativas entre el grupo entrenado con 3.0 mA vs el grupo Bio ($p = 0.0285$) pero no con los grupos de Sch 3.0 mA ($p > 0.999$), 0.0 mA ($p > 0.999$) y 1.0 mA ($p > 0.999$) (Figura 16 C y D).

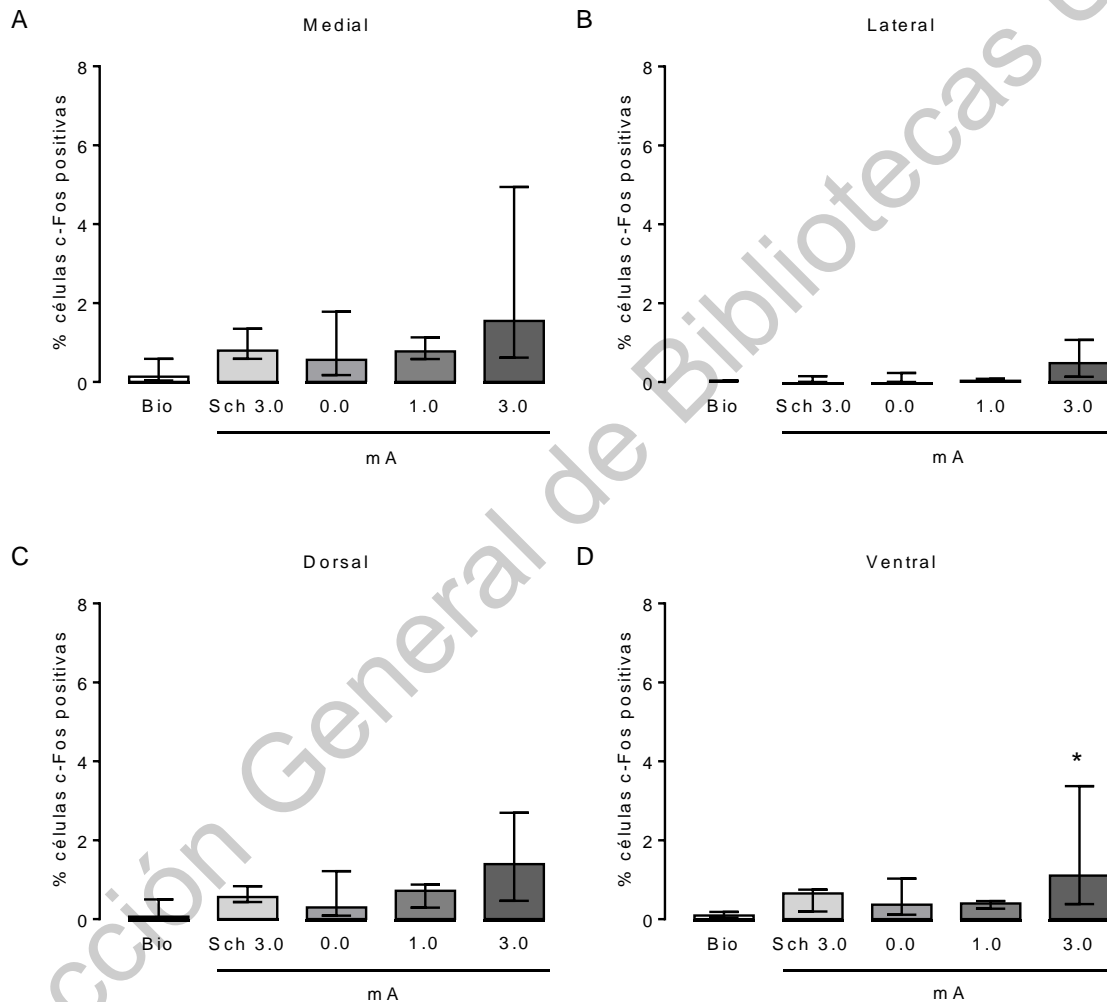


Figura 16. Porcentaje de células c-Fos positivas en regiones del estriado. Gráficas que muestran la mediana del porcentaje de células positivas a c-Fos con rangos intercuartiles de los grupos: bioterio (Bio), sólo choque eléctrico de 3.0 mA (Sch 3.0 mA), entrenados con 0.0 mA, 1.0 mA o 3.0 mA, en la región (A) medial, (B) lateral, (C) dorsal y (D) ventral del estriado dorsal. * $p < 0.05$ comparado con Bio.

Posteriormente decidimos analizar de manera individual la porción dorsal y ventral de la región medial y lateral del estriado. El análisis no mostro diferencias

significativas en la porción dorsal y ventral de la región medial (DM; $H_{(5)} = 6.257$, $p = 0.1808$ y VM; $H_{(5)} = 9.073$, $p = 0.0593$, respectivamente) ni en la porción dorsal de la región lateral (DL; $H_{(5)} = 5.598$, $p = 0.2313$), sin embargo, si se encontraron diferencias en la porción ventral de la región lateral del estriado (VL; $H_{(5)} = 13.01$, $p = 0.0112$). La prueba post-hoc mostró diferencias significativas del grupo entrenado con 3.0 mA con respecto al resto de los grupos (Bio; $p = 0.0291$, Sch 3.0 mA; $p = 0.0343$, 0.0 mA; $p = 0.0471$, 1.0 mA; $p = 0.0247$) (Figura 17 y 18).

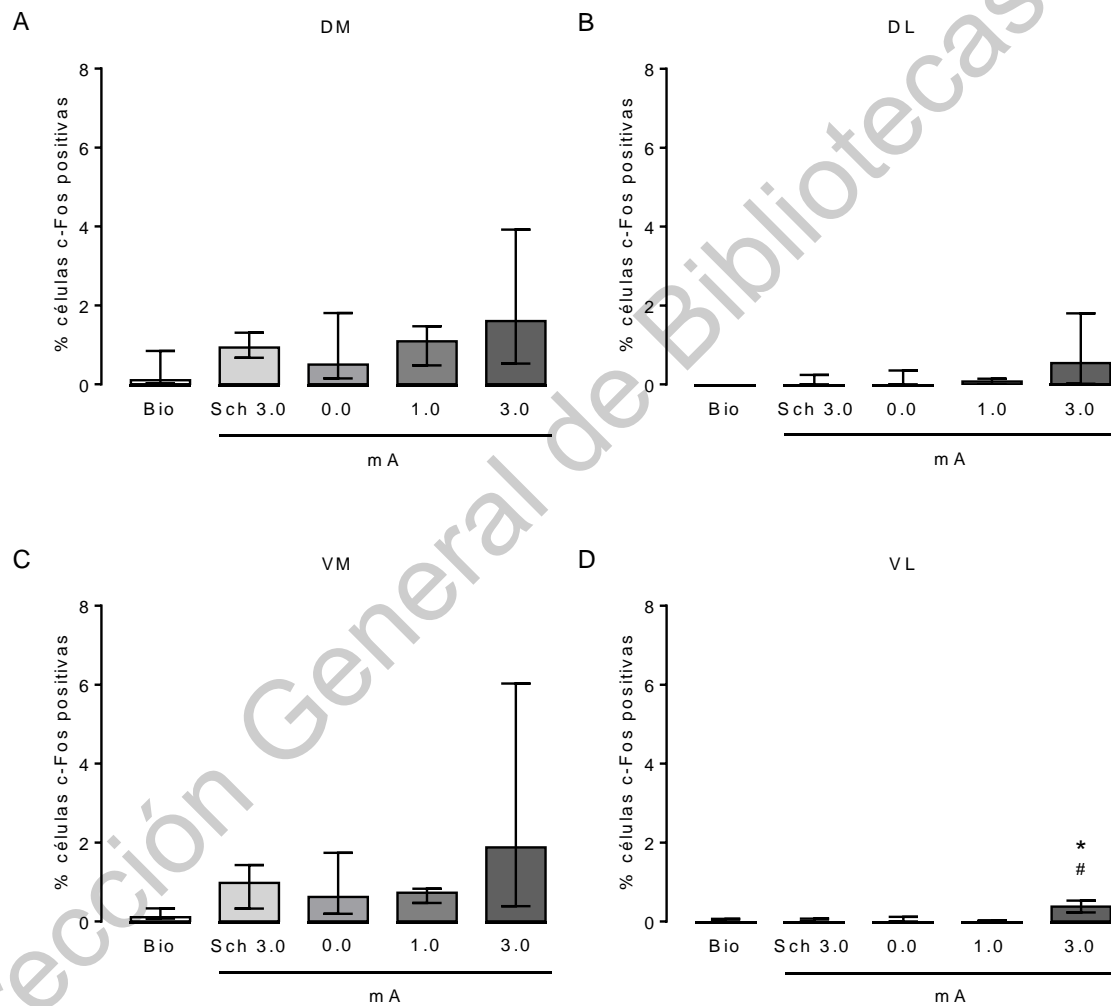


Figura 17. Porcentaje de núcleos c-Fos positivos en porciones del estriado. Gráficas que muestran la mediana del porcentaje de células positivas a c-Fos con rangos intercuartiles de los grupos: bioterio (Bio), sólo choque eléctrico de 3.0 mA (Sch 3.0 mA), entrenados con 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA, en la porción (A) dorsomedial (DM), (B) dorsolateral (DL), (C) ventromedial (VM) y (D) ventrolateral (VL) del estriado. * $p = 0.05$ comparado con Bio y # $p < 0.05$ comparado con el resto de los grupos.

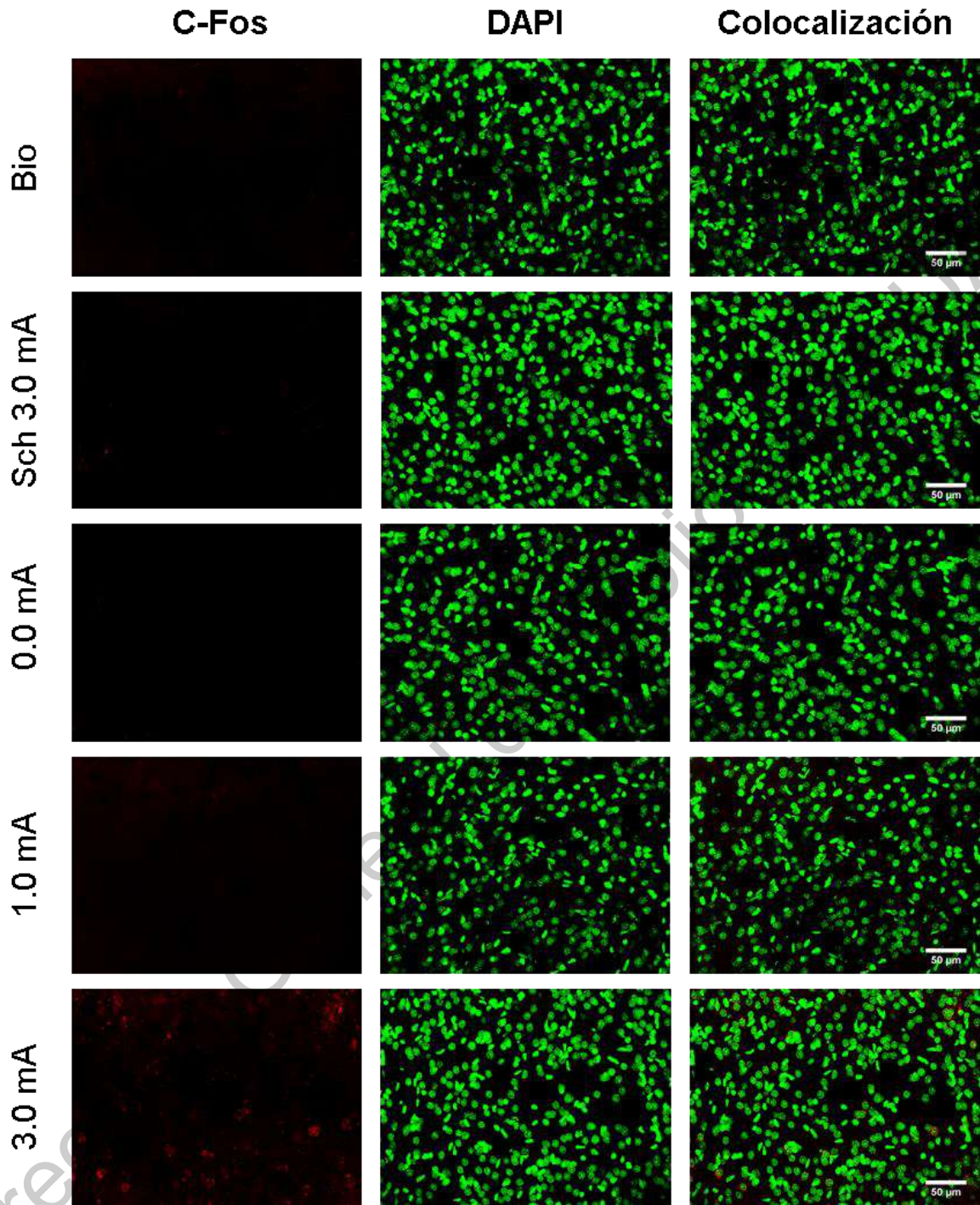


Figura 18. Imágenes representativas de los grupos experimentales (1.0 mA y 3.0 mA) y controles (Bio, Sch 3.0 mA, 0.0 mA) de la porción ventrolateral del estriado. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio Apotome con un objetivo de 40X. En la primera columna se muestra en rojo la señal de c-Fos, en la segunda se observa en verde la contraindicación de DAPI y en la tercera la colocalización de ambas señales.

IX. DISCUSIÓN

En relación a los resultados conductuales observados, las diferencias encontradas en las latencias de escape en los grupos entrenados con 1.0 y 3.0 mA comparados con el grupo que no recibió el choque eléctrico (0.0 mA) se pueden atribuir a la naturaleza aversiva del choque eléctrico durante el entrenamiento, debido a que el estímulo aversivo provoca una conducta de escape al compartimento de seguridad y dado que no hay diferencias significativas en las latencias de escape entre los grupos entrenados con 1.0 y 3.0 mA, se infiere que los grupos de sujetos aquí evaluados tuvieron la misma capacidad motora, perceptual y motivacional para escapar al compartimento oscuro durante el entrenamiento. Cabe mencionar que aunque en el presente trabajo no se midió la latencia de retención de los sujetos entrenados con 1.0 y 3.0 mA, debido a que el objetivo principal del trabajo fue evaluar los posibles cambios en la activación celular después de dos condiciones de entrenamiento, existe una serie de experimentos en los que se ha observado que los sujetos sometidos a un entrenamiento incrementado (3.0 mA) presentan memorias más duraderas comparadas con sujetos entrenados con una entrenamiento moderado (1.0 mA) (Garín-Aguilar et al. 2012; Bello-Medina et al. 2016). Por lo tanto, podemos suponer que los sujetos entrenados en estas dos condiciones de entrenamiento no solo aprendieron la tarea, sino que además los sujetos sometidos a un entrenamiento incrementado tendrían una mayor resistencia a la extinción que los sometidos a un entrenamiento moderado.

Los resultados del análisis inmunohistoquímico de fluorescencia de la proteína c-Fos mostraron un aumento significativo en el porcentaje de núcleos c-Fos positivos en la porción ventrolateral del estriado 90 minutos después de que los sujetos fueron sometidos a la experiencia de aprendizaje, en el grupo entrenado con 3.0 mA comparado con el grupo de 1.0 mA y este aumento también se observó al compararlo con los grupos control (Bio, 0.0 y Sch 3.0 mA), lo cual es similar a lo reportado por González-Franco et al. (2017), quienes observaron un aumento significativo en los niveles de Arc (otro IEG ampliamente usado como marcador de

activación neuronal), pero tanto en la región VM como la región VL del estriado en los animales que fueron entrenados con las intensidades de choque eléctrico más altas comparados con el grupo entrenado con la intensidad baja. En particular, una gran cantidad de evidencia sugiere que *Arc* tienen un papel importante en la dinámica de las grandes redes asociadas con el aprendizaje y la memoria (Gallo, Katche, Morici, Medina y Weisstaub, 2018). Por ejemplo, se sabe que el RNAm de *Arc* es transportado a las dendritas postsinápticas donde participa en el mantenimiento de las sinapsis preexistentes requeridas para algunos mecanismos plásticos como la potenciación y depresión a largo plazo y el aumento de la proteína *Arc* por la actividad sináptica desencadena la remodelación dendrítica (Fujimoto, Tanaka, Kumamaru, Okamura y Miki, 2004; Korb y Finkbeiner, 2011; Peebles et al., 2010; Steward, Farris, Pirbhoy, Darnell y Van Driesche, 2015). Además, en ratones knockout se ha demostrado que *Arc* es necesario para la formación de memorias de largo plazo de tareas de aprendizaje explícito (laberinto acuático de Morris y condicionamiento de miedo contextual) e implícito (condicionamiento de miedo al tono) (Plath et al., 2006). Cabe mencionar que en nuestro trabajo la porción VM muestra una tendencia a ser significativo ($p = 0.0593$) y es probable que aumentado el número de sujetos pueda verse más claramente un incremento en la expresión de c-Fos en esta región.

En trabajos realizados en nuestro laboratorio, en donde se evaluó la expresión de la proteína c-Fos bajo las mismas condiciones experimentales a las nuestras en la región de la amígdala y del hipocampo, se observó que tanto un entrenamiento aversivo intenso (3.0 mA) como un entrenamiento moderado (1.0 mA) son capaces de inducir un incremento significativo en el porcentaje de células c-Fos positivas comparado con el grupo control de bioterio, y en particular el porcentaje de células activas del grupo de 3.0 mA fue significativamente mayor no solo al ser comparado con el resto de los grupos controles (0.0 mA, Sch 3.0 mA) sino también al ser comparado con el grupo entrenado con la intensidad más baja de choque (1.0 mA) (Ruiz-López et al., en preparación). Curiosamente, en un trabajo realizado por Bautista-Montero (2020) en el que exploran también la expresión de la proteína c-

Fos, observaron un incremento en el porcentaje de células positivas en la región del giro dentado del hipocampo, pero únicamente en el grupo de sujetos sometidos a un entrenamiento moderado (1.0 mA) y dicho incremento no solo fue significativamente mayor comparado con los grupos controles (Bio, Sch 1.0 mA, Sch 3.0 mA), sino también comparado con el grupo de sujetos sometidos a un entrenamiento incrementado (3.0 mA). Con relación a estas observaciones se ha propuesto que la diferencia observada en el porcentaje de células positivas a c-Fos en el hipocampo, en los sujetos entrenados con un estímulo aversivo intenso (3.0 mA) y moderado (1.0 mA) pueda deberse a una modulación inducida por la región de la amígdala, en donde se observaron cambios significativos en el porcentaje de células c-Fos positivas en ambas condiciones de entrenamiento.

Dicha propuesta está relacionada con lo reportado por Packard et al. (1994) quienes observaron que la inducción de la liberación de norepinefrina en la amígdala, mediante la administración de un fármaco ansiogénico (RS 79948), produjo un impedimento en el aprendizaje dependiente del hipocampo, sin embargo también se observó que la amígdala no solo tiene un efecto modulador en aprendizajes dependientes del hipocampo sino también en aprendizajes dependientes del estriado, y observaron que la administración de RS 79948 indujo un efecto facilitador en el aprendizaje dependiente del estriado. 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 un choque eléctrico en las patas, se ha observado que promueve la liberación de norepinefrina en la amígdala y además dicho incremento puede ser proporcional a la intensidad del estímulo eléctrico (Quirarte, Galvez, Roozendaal y McGaugh, 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 o en el estriado 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 la condición de 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 al hipocampo para poder promover el establecimiento de la memoria. Mientras que en la condición en la cual los sujetos son entrenados con una alta intensidad de choque, en donde es probable que el incremento de la liberación de norepinefrina sea mayor en la amígdala, así como su activación celular, ésta ahora reclutará al estriado para la formación de la memoria de largo plazo, probablemente en este caso en la región ventrolateral del estriado por medio de sus proyecciones directas que presenta el complejo basolateral de la amígdala (BL) al cuerpo estriado ventrolateral (McDonald, 1991a, 1991b); o indirectas a través de la corteza insular agranular (Krettek y Price, 1977), sitio que además se ha relacionado con la formación de memorias de asociaciones motivadas aversivamente (Bermudez-Rattoni, 2014). Cabe mencionar que el BL no solo tiene proyecciones directas a la porción ventrolateral del estriado, sino que también proyecta al cuerpo estriado en su porción medial, y aunque los análisis estadísticos no mostraron cambios significativos en la región VM del estriado, si se observa una tendencia a un incremento en el porcentaje de células positivas a c-Fos, razón por la cual es probable que si aumentamos el número de sujetos en el análisis pueda verse más claramente un efecto. Sin embargo, es necesario someter a experimentación la propuesta planteada por el grupo de Packard y Kim (1994) y si éste mismo resultado puede ser observado en la tarea de evitación inhibitoria con ambas condiciones de entrenamiento.

Por último, el hecho de no encontrar cambios significativos en la expresión de c-Fos en los sujetos sometidos a un entrenamiento moderado en las otras regiones del estriado analizadas, no descarta la posibilidad de que estas regiones se encuentren involucradas en la formación de la memoria de la tarea de evitación inhibitoria, ya que pueden existir tiempos de expresión diferenciales debidos al procesamiento de

la información post-entrenamiento dependiendo de la región. En este sentido, Bello-Medina et al. (2016) reportaron cambios en las espinas dendríticas asociadas al entrenamiento en la porción DM del estriado, pero en una etapa más tardía (6 y 24 horas después del entrenamiento) en los sujetos sometidos a un entrenamiento moderado e incrementado, por lo que es posible que en el estriado (o en regiones particulares del mismo) ocurra una segunda oleada de expresión de c-Fos involucrada en la persistencia del almacenamiento de la memoria de largo plazo, como se ha visto en el hipocampo en condiciones de entrenamiento con una alta intensidad de choque eléctrico en una tarea de evitación inhibitoria (Katche et al., 2010); sin embargo, valdría la pena explorar temporalmente los patrones de expresión de c-Fos en el estriado bajo ambas condiciones de entrenamiento para comprobar esta hipótesis.

X. CONCLUSION

Los datos obtenidos en esta tesis muestran que:

- 1.- Los sujetos entrenados con 3.0 mA presentaron un incremento significativo en el porcentaje de células c-Fos positivas en la porción ventrolateral del estriado.
- 2.- Es probable que los cambios observados en el porcentaje de células positivas a c-Fos en la región del estriado de los sujetos entrenados con un estímulo aversivo intenso (3.0 mA) puedan deberse a una modulación inducida por la amígdala, ya que es un sitio que presenta conexiones directas o indirectas con esta región.
- 3.- El hecho de no encontrar cambios significativos en la expresión de c-Fos en el grupo de sujetos sometidos a un entrenamiento moderado en las otras regiones del estriado analizadas no descarta la posibilidad de que estas regiones se encuentren involucradas en la formación de la memoria de una tarea de evitación inhibitoria, o que puedan existir tiempos de expresión diferenciales dependiendo de las regiones, debidas a un efecto de procesamiento de la información post-entrenamiento.

XI. Referencias

Abraham, W. C., Mason, S. E., Demmer, J., Williams, J. M., Richardson, C. L., Tate, W. P., & Dragunow, M. (1993). Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation. *Neuroscience*, 56(3): 717-727 doi:10.1016/0306-4522(93)90369-Q

Aggleton, J. P., Brown, M. W., & Albasser, M. M. (2012). Contrasting brain activity patterns for item recognition memory and associative recognition memory: Insights from immediate-early gene functional imaging. *Neuropsychologia*, 50: 3141-3155 doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2012.05.018

Aguado-Aguilar, L. (2001). Aprendizaje y memoria. *Revista de Neurología*, 32 (4): 373-381

Alberini, C. M. (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological Reviews*, 89(1): 121-145 doi:10.1152/physrev.00017.2008

Balleine, B. W., & O'Doherty, J. P. (2010). Human and rodent homologues in action control: Corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action. *Neuropsychopharmacology Reviews* 35: 48–69 doi:10.1038/npp.2009.131

Banai, K., Ortiz, J. A., Oppenheimer, J. D., & Wright, B. A. (2010). Learning two things at once: Differential constraints on the acquisition and consolidation of perceptual learning. *Neuroscience*, 165(2): 436-444 doi:10.1016/j.neuroscience.2009.10.060

Barron, A. B., Hebets, E. A., Cleland, T. A., Fitzpatrick, C. L., Hauber, M. E., & Stevens, J. R. (2015). Embracing multiple definitions of learning. *Trends in Neurosciences*, 38 (7): 405-407 doi 10.1016/j.tins.2015.04.008

Bautista-Montero, Z. (2020). Determinación de la expresión de la proteína c-Fos en el giro dentado del hipocampo en condiciones de entrenamiento aversivo intenso y

moderado. (Tesis de Licenciatura). Instituto de Neurobiología, UNAM, Juriquilla, Qro.

Bello-Medina, P. C., Flores, G., Quirarte, G. L., McGaugh, J. L., & Prado Alcala, 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*, 113(42): 6516-6525 doi:10.1073/pnas.1613680113

Bermudez-Rattoni, F. (2014). The forgotten insular cortex: Its role on recognition memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 109: 207-216 doi: 10.1016/j.nlm.2014.01.001

Bertaina-Anglade, V., Tramu, G., & 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 mice. *European Journal of Neuroscience*, 12: 3803-3812 doi:10.1046/j.14609568.2000.00258.x

Bolam, J. P., Izzo, P. N., & Graybiel, A. M. (1988). Cellular substrate of the histochemically defined striosome/matrix system of the caudate nucleus: A combined golgi and immunocytochemical study in cat and ferret. *Neuroscience*, 24 (3): 853-875 doi: 10.1016/0306-4522(88)90073-5

Brakeman, P. R., Lanahan, A. A., O'Brien, R., Roche, K., Barnes, C. A., Huganir, R. L., & Worley, P. F. (1997). Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature*, 386(6622): 284-288 doi: 10.1038/386284a0

Brog, J. S., Salyapongse, A., Deutch, A. Y., & Zahm, D. S. (1993). The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat central striatum: Immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *The Journal of Comparative Neurology*, 338: 255-278 doi: 10.1002/cne.903380209

Bullitt, E. (1990). Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 296: 517-530 doi: 10.1002/cne.902960402

Burton, A. C., Nakamura, K., & Roesch, M. R. (2014). From ventral-medial to dorsal-lateral striatum: Neural correlates of reward-guided decision-making. *Neurobiology of Learning and Memory*, 117: 51-59 doi: 10.1016/j.nlm.2014.05.003

Cardinal, R. N., Parkinson, J. A., Hall, J., & Everitt, B. J. (2002). Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum and prefrontal cortex. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26: 321-352 doi:10.1016/s0149-7634(02)00007-6

Cirelli, C., & Tononi, G. (2000). On the functional significance of c-fos induction during the sleep-waking cycle. *Sleep*, 23 (4): 453-469 PMID: 10875553

Cobos-Zapalaín, G. G., Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavez, M., Quirarte, G. L., Roldán-Roldán, G., Díaz del Guante, M. A., & 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 doi:10.1006/nlme.1996.0024

Cochran, B., Zullo, J., Verma, I., & Stiles, C. (1984). Expression of the c-fos gene and of an fos-related gene is stimulated by platelet-derived growth factor. *Science*, 226(4678): 1080-1082 doi:10.1126/science.6093261

Colombo, P. J., Brightwell, J. J., & Countryman, R. A. (2003). Cognitive strategy-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein and c-Fos in the hippocampus and dorsal striatum. *The Journal of Neuroscience*, 23 (8): 3547-3554 doi:10.1523/JNEUROSCI.23-08-03547.2003

Corbit, L. H., Leung, B. K., & Balleine, B. W. (2013). The role of the amygdala-striatal pathway in the acquisition and performance of goal-directed instrumental actions. *The Journal of Neuroscience*, 33(45): 17682-17690 doi:10.1523/JNEUROSCI.3271-13.2013

Corbit, L. H., Muir, J. L., & Balleine, B. W. (2001). The role of the nucleus accumbens in instrumental conditioning: Evidence of a functional dissociation between

accumbens core and shell. *The Journal of Neuroscience*, 21(9): 3251-3260 doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-09-03251.2001

Cruz-Morales, S. E., Duran-Arevalo, M., Díaz del Guante, M. A., Quirarte, G., & Prado-Alcalá, R. A. (1992). A threshold for the protective effect of over-reinforced passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Behavioral and Neural Biology*, 57(3): 256-259 doi: 10.1016/0163-1047(92)90248-3

Davis, H. P., & Squire, L. R. (1984). Protein synthesis and memory: A review. *Psychological Bulletin*, 96(3): 518-559 PMID: 6096908

Darwin, C. (1857). *El origen de las especies*. Madrid, 1921.

De Houwer, J., Holmes-Barnes, D., & Moors, A. (2013). What is learning? On the nature and merits of a functional definition of learning. *Psychonomic Bulletin & Review*, 20: 631-642 doi: 10.3758/s13423-013-0386-3

Díaz del Guante, M. A., Cruz-Morales, S. E., & Prado-Alcalá, R. A. (1991). Time-dependent effects of cholinergic blockade of the striatum on memory. *Neuroscience Letters*, 122(1): 79-82 doi:10.1016/0304-3940(91)90198-3

Domjan, M. (2005). Pavlovian conditioning: A functional perspective. *Annual Review of Psychology*, 56: 179-206 doi:10.1146/annurev.psych.55.090902.141409

Domjan, M. (2010). *Principios de aprendizaje y conducta*. Sexta Edición.

Dudai, Y. (2004). The Neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology*, 55: 51-86 doi: 10.1146/annurev.psych.55.090902.142050

Dudai, Y. (2012). The restless engram: Consolidation never end. *Annual Review of Neuroscience*, 35: 227-247 doi: 10.1146/annurev-neuro-062111-150500

Dudai, Y., Karni, A., & Born, J. (2015). The consolidation and transformation of memory. *Neuron*, 88: 20-32 doi:10.1016/j.neuron.2015.09.004

Durán-Arévalo, M., Cruz-Morales, S. E., & Prado-Alcalá, R. A. (1990). Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Research Bulletin*, 24: 725-727 doi:10.1016/0361-9230(90)90129-n

Fanselow, M. S., & Wassum, K. M. (2016). The origins and organization of vertebrate pavlovian conditioning. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. doi:10.1101/cshperspect.a021717

Filipkowski R.K., Knapska E., & Kaczmarek L. (2006) c-Fos and Zif268 in Learning and Memory—Studies on Expression and Function. In: Pinaud R., Tremere L.A. (eds) *Immediate Early Genes in Sensory Processing, Cognitive Performance and Neurological Disorders*. Springer, Boston, MA

Fleischmann, A., Hvalby, O., Jensen, V., Strelakova, T., Zacher, C., Layer, L. E., Kvello, A., Reschke, M., Spanagel, R., Sprengel, R., Wagner, E. F., & Gass, P. (2003). Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. *The Journal of Neuroscience*, 23: 9116–9122 doi: 10.1523/jneurosci.23-27-09116.2003

Fuccillo, M. V. (2016). Striatal circuits as a common node for autism pathophysiology. *Frontiers in Neuroscience*, 10 (27): doi: 10.3389/fnins.2016.00027

Fujimoto, T., Tanaka, H., Kumamaru, E., Okamura, K., & Miki, N. (2004). Arc interacts with microtubules/microtubule-associated protein 2 and attenuates microtubule-associated protein 2 immunoreactivity in the dendrites. *Journal of Neuroscience Research*, 76: 51–63 doi: 10.1002/jnr.20056

Gallo, F. T., Katche, C., Morici, J. F., Medina, J. H., & Weisstaub, N. V. (2018). Immediate early genes, memory and psychiatric disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12 (79): 1-16 doi:10.3389/fnbeh.2018.00079

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): 6 doi: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 doi:10.1002/hipo.22210

Gerber, B., Yarali, A., Diegelmann, S., Wotjak, C., Pauli, P., & Fendt, M. (2014). Pain-relief learning in flies, rats, and man: basic research and applied perspectives. *Learning & Memory*, 21 (4): 232-252 doi: 10.1101/lm.032995.113

Gerfen, C. R. (1984). The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature*, 311 (5985): 461-464 doi: 10.1038/311461a0

Gerfen, C. R. (1985). The neostriatal mosaic. I. Compartmental organization of projections from the striatum to the substantia nigra in rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 236: 454-476 doi: 10.1002/cne.902360404

Gerfen, C. R. (1992). The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends in Neurosciences*, 15 (4): 133-139 doi: 10.1016/0166-2236(92)90355-c

Gerfen, C. R. (2006). Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson disease. *Nature Neuroscience*, 9 (2): 157-158 doi:10.1038/nn0206-157

Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma, F. J., & Sibley, D. R. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*, 250 (4986): 1429-1432 doi: 10.1126/science.2147780

Gerfen, C. R., & Bolam, J. P. (2017). The Neuroanatomical Organization of the Basal Ganglia. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 24, Elsevier Inc: 3-32 doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802206-1.00001-5>

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 doi:10.1016/0091-3057(86)90435-1

Gold, P. E. (1986). The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behavioral and Neuronal Biology*, 46: 87-98 doi:10.1016/s0163-1047(86)90927-1

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 doi:10.1016/j.nlm.2017.02.001

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 doi: 10.1016/j.brainresbull.2019.06.005

Goodman, J., & Packard, M. G. (2017). Memory systems of the basal ganglia. In *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function* (Second edi, pp. 725-740) doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802206-1.00035-0>

Graybiel, A. M., Baughman, R. W., & Eckenstein, F. (1986). Cholinergic neuropil of the striatum observes striosomal boundaries. *Nature*, 323: 625-627 doi: 10.1038/323625a0

Graybiel, A. M., & Ragsdale, C. W. (1978). Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase

staining. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75 (11): 5723-5726 doi: 10.1073/pnas.75.11.5723

Greenberg, M. E., & Ziff, E. B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature*, 311(5985): 433-438 doi:10.1038/311433a0

Greenberg, M. E., Ziff, E. B., & Greene, L. A. (1986). Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science*, 234(4772): 80-83 doi:10.1126/science.3749894

Groenewegen, H.J., Mulder, A. B., Beijer, A. V. J., Wright, C. I., Lopes da Silva, F. H., & Pennartz, C. M. A. (1999) Hippocampal and amygdaloid interactions in the nucleus accumbens. *Psychobiology* 27: 149–164

Grofová, I. (1975). The identification of striatal and pallidal neurons projecting to substantia nigra. An experimental study by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxide. *Brain Research*, 91(2): 268-291 doi: 10.1016/0006-8993(75)90550-8

Guzowski, J. F., Setlow, B., Wagner, E. K., & 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. *The Journal of Neuroscience*, 21(14): 5089-5098 doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-14-05089.2001

Guzowski, J. F., McNaughton, B. L., Barnes, C. A., & Worley, P. F. (1999). Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nature Neuroscience*, 2(12): 1120-1124 doi: 10.1038/16046

Guzowski, J. F. (2002). Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus*, 12(86): 86-104 doi: 10.1002/hipo.10010

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 doi:10.1016/S0893-133X(01)00332-3

Herdegen, T., & Zimmermann, M. (1994). Immediate early genes (IEGs) encoding for inducible transcription factors (ITFs) and neuropeptides in the nervous system: functional network for long-term plasticity and pain. *Progress in Brain Research*, 104: 299-321 doi:10.1016/s0079-6123(08)61797-5

Herkenham, M., & Pert, C. B. (1981). Mosaic distribution of opiate receptors parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum. *Nature*, 291 (5814): 415-418 doi: 10.1038/291415a0

Herrera, D. G., & Robertson, H. A. (1996). Activation of c-fos in the brain. *Progress in Neurobiology*, 50: 83-101 doi: 10.1016/s0301-0082(96)00021-4

Hess, U., Lynch, G., & Gall, C. (1995). Regional patterns of c-fos mRNA expression in rat hippocampus following exploration of a novel environment versus performance of a well-learned discrimination. *The Journal of Neuroscience*, 15(12): 7796-7809 doi:10.1523/jneurosci.15-12-07796.1995

Hoffman, G. E., Smith, M. S., & Verbalis, J. G. (1993). c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 14(3): 173-213 doi:10.1006/frne.1993.1006

Hughes, P., Lawlor, P., & Dragunow, M. (1992). Basal expression of Fos, Fos-related, Jun, and Krox 24 proteins in rat hippocampus. *Molecular Brain Research*, 13(4): 355-357 doi: 10.1016/0169-328x(92)90219-2

Jarvik, M. E., & Kopp, R. (1967). An improved one-trial passive avoidance learning situation. *Psychological Reports*, 21(1): 221-224 doi:10.2466/pr0.1967.21.1.221

Jaworski, J., Kalita, K., & Knapska, E. (2018). c-Fos and neuronal plasticity: the aftermath of Kaczmarek's theory. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 78: 287-296 doi: 10.21307/ane-2018-027

Kaczmarek, L. (1993). Molecular biology of vertebrate learning: Is c-fos a new beginning? *Journal of Neuroscience Research*, 34: 377-381 doi: 10.1002/jnr.490340402

Kandel, E. R. (2013). *Principles of neural science*. New York: McGraw-Hill.

Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., & Nakahara, H. (2003). Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *TRENDS in Neurosciences*, 26(7): 360-368 doi:10.1016/S0166-2236(03)00162-0

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*, 107: 349-354 doi: 10.1073/pnas.0912931107

Katche, C., & Medina, J. H. (2017). Requirement of an early activation of BDNF/c-Fos cascade in the retrosplenial cortex for the persistence of a long-lasting aversive memory. *Cerebral Cortex*, 27: 1060–1067. doi: 10.1093/ cercor/bhv284

Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J., & Emson, P. C. (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neuroscience*, 18 (12): 527-535 doi:10.1016/0166-2236(95)98374-8

Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., & Emson, P. C. (1990). Projection subtypes of rat neostriatal matrix revealed by intracellular injection of biocytin. *The Journal of Neuroscience*, 10 (10): 3421-3438 doi: 10.1523/JNEUROSCI.10-10-03421.1990

Kim, J. J., Lee, H. J., Han, J. S., & 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 doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-14-05222.2001

Klann, E., & Dever, T. E. (2004). Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(12): 931-942 doi:10.1038/nrn1557

Korb, E., & Finkbeiner, S. (2011). Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends in Neurosciences*, 34 (11): 591-598 doi:10.1016/j.tins.2011.08.007

Kovács, K. J. (1988). c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochemistry International*, 33: 287-297 doi:10.1016/s0197-0186(98)00023-0

Kreitzer, A. C. (2009). Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annual Review of Neuroscience*, 32: 127-147 doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135422

Kreitzer, A. C., & Malenka, R. C. (2008). Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. *Neuron*, 60: 543-554 doi: 10.1016/j.neuron.2008.11.005

Krettek, J. E., & Price, J. L. (1977). Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat. *Journal of Comparative Neurology*, 172: 687-722 doi: 10.1002/cne.901720408

Kruijer, W., Cooper, J. A., Hunter, T., & Verma, I. M. (1984). Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein. *Nature*, 312(5996): 711-716 doi:10.1038/312711a0

Kubik, S., Miyashita, T., & Guzowski, J.F. (2007). Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learning and memory*, 14: 758-770 doi: 10.1101/lm.698107

Lachman, S. J. (1997) Learning is a Process: Toward an improved definition of learning. *The Journal of Psychology: Interdisciplinary and Applied*, 131(5): 477-480 doi: 10.1080/00223989709603535

Lamprecht, R., & Dudai, Y. (1996). Transient expression of c-Fos in rat amygdala during training is required for encoding conditioned taste aversion memory. *Learning & Memory*, 3(1): 31-41 doi:10.1101/lm.3.1.31

Lanahan, A., & Worley, P. (1998). Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiology of Learning and Memory*, 70(1): 37-43 doi:10.1006/nlme.1998.3836

Lin, X., Itoga, C. A., Taha, S., Li, M. H., Chen, R., Sami, K., Berton, F., Francesconi, W., & Xu, X. (2018). c-Fos mapping of brain regions activated by multi-modal and electric foot shock stress. *Neurobiology of Stress*, 8: 92-102 doi: 10.1016/j.ynstr.2018.02.001

Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., & Worley, P. F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*, 14(2): 433-445 doi:10.1016/0896-6273(95)90299-6

Manella, F., Gurney, K., & Baldassarre, G. (2013). The nucleus accumbens as a nexus between values and goals in goal-directed behavior: a review and a new hypothesis. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7 (135): 1-29 doi:10.3389/fnbeh.2013.00135

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, Juriquilla, Qro.

Martinez, R. C. R., Gupta, N., Lázaro-Muñoz, G., Sears, R. M., Kim, S., Moscarello, J. M., LeDoux, J. E., & 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 doi:10.1101/lm.031047.113

Mayford, M., Siegelbaum, S. A., & Kandel, E. R. (2012). Synapses and memory storage. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6): 1-18 doi: 10.1101/cshperspect.a005751

McDonald, A. J. (1982). Neurons of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei: A golgi study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 212: 293-312 doi: 10.1002/cne.902120307

McDonald, A. J. (1984). Neuronal organization of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 222: 589-606 doi: 10.1002/cne.902220410

McDonald, A. J. (1991a). Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. *Neuroscience*, 44: 1-14 doi: 10.1016/0306-4522(91)90247-l

McDonald, A. J. (1991b). Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. *Neuroscience*, 44 (1): 15-33 doi: 10.1016/0306-4522(91)90248-m

McGaugh, J. L. (2000). Memory-a century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248-251 doi:10.1126/science.287.5451.248

Morgan, J. I., & Curran, T. (1986). Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature*, 322(6079): 552-555 doi:10.1038/322552a0

Morgan, J. I., & Curran, T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: Involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual Review of Neuroscience*, 14: 421-451 doi:10.1146/annurev.ne.14.030191.002225

Morrow, B. A., Elsworth, J. D., Inglis, F. M., & Roth, R. H. (1999). An antisense oligonucleotide reverses the footshock-induced expression of Fos in the rat medial prefrontal cortex and the subsequent expression of conditioned fear-induced

immobility. *The Journal of Neuroscience*, 19(13): 5666-5673
doi:10.1523/jneurosci.19-13-05666.1999

Mugnaini, E., Berrebi, A. S., Morgan, J. I., & Curran, T. (1989). Fos-like immunoreactivity induced by seizure in mice is specifically associated with euchromatin in neurons. *European Journal of Neuroscience*, 1(1): 46-52
doi:10.1111/j.1460-9568.1989.tb00773.x

Nadel, L., Hubbach, A., Gomez, R., & Newman-Smith, K. (2012). Memory formation, consolidation and transformation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(7), 1640-1645 doi:10.1016/j.neubiorev.2012.03.001

Netto, C. A., & Izquierdo, I. (1985). On how passive is inhibitory avoidance. *Behavioral and Neural Biology*, 43(3), 327-330 doi:10.1016/S0163-1047(85)91697-8

Nieh, E. H., Kim, S-Y., Namburi, P., & Tye, K. M. (2013). Optogenetic dissection of neural circuits underlying emotional valence and motivated behaviors. *Brain Research*, 1511: 73-92 doi: 10.1016/j.brainres.2012.11.001

Nikolaev, E., Kamiska, B., Tischmeyer, W., Matthies, H., & Kaczmarek, L. (1992a). Induction of expression of genes encoding transcription factors in the rat brain elicited by behavioural training. *Brain Research Bulletin*, 28: 479-484 doi: 10.1016/0361-9230(92)90050-8

Nikolaev, E., Werka, T., & Kaczmarek, L. (1992b). c-fos protooncogene expression in rat brain after long-term training of two-way active avoidance reaction. *Behavioural Brain Research*, 48: 91-94 doi: 10.1016/s0166-4328(05)80143-3

Nikolaev, E., Kaczmarek, L., Zhu, S. W., Winblad, B., & Mohammed, A. H. (2002). Environmental manipulation differentially alters c-Fos expression in amygdaloid nuclei following aversive conditioning. *Brain Research*, 957: 91-98 doi: 10.1016/s0006-8993(02)03606-5

Ogren, S., & Stiedl, O. (2013). Passive Avoidance. In I. P. Stolerman (Ed.), *Encyclopedia of Psychopharmacology* (Vol. 2 (L-Z), pp. 960-967): Springer

Okuno, H. (2011). Regulation and function of immediate-early genes in the brain: Beyond neuronal activity markers. *Neuroscience Research*, 69(3): 175-186 doi:10.1016/j.neures.2010.12.007

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: 8477-8481 doi:10.1073/pnas.91.18.8477

Packard, M. G., & Knowlton, B. J. (2002). Learning and memory functions of the basal ganglia. *Annual Review of Neuroscience*, 25: 563-593 doi:10.1146/annurev.neuro.25.112701.142937

Peebles, C. L., Yoo, J., Thwin, M. T., Palop, J. J., Noebels, J. L., & Finkbeiner, S. (2010). Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (42): 18173-18178 doi:10.1073/pnas.1006546107

Pérez-Ruíz, 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 doi:10.1016/0361-9230(89)90076-2

Pistell, P. J., Nelson, C. M., Miller, M. G., Spangler, E. L., Ingram, D. K., & Devan, B. D. (2009). Striatal lesions interfere with acquisition of a complex maze task in rats. *Behavioral Brain Research*, 197(1): 138–143 doi:10.1016/j.bbr.2008.08.015

Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M. L., Schmitz, D., Gross, C., Mao, X., Engelsberg, A., Mahike, C., Welzl, H., Kobalz, U., Stawrakakis, A., Fernandez, E., Waltereit, R., Bick-Sander, A., Therstappen, E., Cooke, S. F., Blanquet, V., Wurst, W., Salmen, B., Bosl, M. R., Lipp, H-P., Grant, S. G. N., Bliss, T. V. P., Wolfer, D. P., & Kuhl, D. (2006). Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation

of synaptic plasticity and memories. *Neuron*, 52: 437–444 doi: 10.1016/j.neuron.2006.08.024

Prado-Alcalá, R. A. (1995). Serial and parallel processing during memory consolidation. In J. L. McGaugh, F. Bermúdez-Rattoni, & R. A. Prado-Alcalá (Eds.), *Plasticity in the central nervous system: learning and memory* (pp. 57-65). New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates.

Prado-Alcalá, R. A., & Cobos-Zapíaín, G. G. (1977). Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a function of experience. *Brain Research*, 138(1): 190-196 doi:10.1016/0006-8993(77)90797-1

Prado-Alcalá, R. A., & Cobos-Zapíaín, G. G. (1979). Interference with caudate nucleus activity by potassium chloride. Evidence for a 'moving' engram. *Brain Research*, 172: 577-583 doi: 10.1016/0006-8993(79)90592-4

Prado-Alcalá, R. A., Cobos-Zapíaín, G., Salado-Castillo, R., Quiroz, C., Garín-Aguilar, M. E., Díaz, A., Díaz del Guante, M. A., Medina, A. C., Martínez, I., & Quirarte, G. L., (2006). El aprendizaje incrementado protege a la memoria contra tratamientos amnésicos. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*, 32: 203-218

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: 501-508 doi: 10.1515/revneuro-2012-0061

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: 21-29 doi:10.1016/j.nlm.2016.12.018

Quirarte, G. L., Cruz-Morales, S. E., Díaz del Guante, M. A., García, M., & Prado-Alcalá, R.A. (1993). Protective effect of under-reinforcement of passive avoidance

against scopolamine-induced amnesia. *Brain Research Bulletin*, 32: 521-524
doi:10.1016/0361-9230(93)90301-q

Quirarte, G. L., Galvez, R., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1998). Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock and opioid peptidergic drugs. *Brain Research*, 808: 134-140 doi: 10.1016/s0006-8993(98)00795-1

Radwanska, K., Nikolaev, E., Knapska, 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 doi: 10.1097/01.wnr.0000045006.52875.93

Ramirez, F., Moscarello, J. M., LeDoux, J. E., & Sears, R. M. (2015). Active avoidance requires a serial basal amygdala to nucleus accumbens shell circuit. *The Journal of Neuroscience*, 35 (8): 3470-3477 doi:10.1523/JNEUROSCI.1331-14.2015

Reynolds, G. S. (1968). *Compendio de condicionamiento operante*. México. Editorial Ciencia en la Conducta.

Ruiz-López, C. X., Medina, A. C., Bello-Medina, P. C., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2020). Differential c-Fos expression in amygdala nuclei after moderate and intense inhibitory avoidance training. Artículo en preparación.

Saffen, D. W., Cole, A. J., Worley, P. F., Christy, B. A., Ryder, K., & 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 doi:10.1073/pnas.85.20.7795

Salado-Castillo, R., Díaz del Guante, M. A., Alvarado, R., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (1996). Effects of regional GABAergic blockade of the striatum on memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 66(2): 102-108 doi:10.1006/nlme.1996.0051

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 doi:10.3389/fnbeh.2011.00083

Sanyal, S., Sandstrom, D. J., Hoeffler, C. A., & Ramaswami, M. (2002). AP-1 functions upstream of CREB to control synaptic plasticity in *Drosophila*. *Letters to Nature*, 416: 870-874 doi: 10.1038/416870a

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 doi: 10.1016/s0306-4522(99)00331-0

Solana-Figueroa, R., Salado-Castillo, R., Quirarte, G. L., Galindo, L. E., & Prado-Alcalá, R. A. (2002). Enhanced inhibitory avoidance training protects against the amnesic effect of p-chloroamphetamine. *Life Sciences*, 71: 391-399 doi: 10.1016/s0024-3205(02)01684-3

Sotty, F., Sandner, G., & Gosselin, O. (1996). Latent inhibition in conditioned emotional response: c-fos immunolabelling evidence for brain areas involved in the rat. *Brain Research*, 737: 243-254 doi: 10.1016/0006-8993(96)00737-8

Sprott, R. L., & Stavnez, K. L. (1974). Active- and passive- avoidance learning in inbred mice: Transfer of training effects. *Animal Learning & Behavior*, 2 (3): 225-228 <https://doi.org/10.3758/BF03199184>

Squire, L. R., & Zola-Morgan, S. (1988). Memory: Brain systems and behavior. *Trends in Neurosciences*, 11(4): 170-175 doi:10.1016/0166-2236(88)90144-0

Squire, L. R., Genzel, L., Wixted, J. T., & Morris, R. G. (2015). Memory consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7: 1-21 doi: 10.1101/cshperspect.a021766

Squire, L. R., & Zola-Morgan, M. J. (1991). The brain and memory. *Oxford Review of Science and Religion*, 13(1), 1-14. doi: 10.1093/oxfordjournals.oxrev.a021667

Steward, O., Farris, S., Pirbhoy, P. S., Darnell, J., & Van Driesche, S. J. (2015). Localization and local translation of Arc/Arg3.1 mRNA at synapses: some observations and paradoxes. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7 (101): 1-15 doi: 10.3389/fnmol.2014.00101

Sutherland, R. J., Lee, J. Q., McDonald, R. J., & Lehman, H. (2019). Has multiple trace theory been refuted? *Hippocampus*: 1-9 doi: 10.1002/hipo.23162

Szapiro, G., Galante, J. M., Barros, D. M., Levi de Stein, M., Vianna, M. R. M., Izquierdo, L. A., & Medina, J. H. (2002). Molecular mechanisms of memory retrieval. *Neurochemical Research*, 27(11): 1491-1498 doi:10.1023/a:1021648405461

Teather, L. A., Packard, M. G., Smith, D. E., Ellis-Behnke, R. G., & Bazan, N. G. (2005). Differential induction of c-Jun and Fos-like proteins in rat hippocampus and dorsal striatum after training in two water maze task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 84: 75-84 doi:10.1016/j.nlm.2005.03.006

Tepper, J. M., & Bolam, J. P. (2004). Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current Opinion in Neurobiology*, 14: 685-692 doi: 10.1016/j.conb.2004.10-003

Tooby, J., & Cosmides, L., (1990). The past explains the present: emotional adaptations and the structure of ancestral environments. *Ethology and Sociobiology*, 11: 375-424 [https://doi.org/10.1016/0162-3095\(90\)90017-Z](https://doi.org/10.1016/0162-3095(90)90017-Z)

Tulodgi, A., Sörös, P., Tóth, M., Nagy, R., Biró, L., Aliczki, M., Klausz, B., Mikics, É., & Haller, J. (2012). Temporal changes in c-Fos activation patterns induced by conditioned fear. *Brain Research Bulletin*, 88: 359-370 doi: 10.1016/j.brainresbull.2012.04.001

Van der Werf, Y.D., Witter, M. P., & Groenewegen, H. J. (2002) The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Research Review*, 39: 107–140 doi: 10.1016/s0165-0173(02)00181-9

Vann, S. D., Brown, M. W., Erichsen, J. T., & Aggleton, J. P. (2000). Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests. *The Journal of Neuroscience*, 20(7): 2711-2718 doi:10.1523/JNEUROSCI.20-07-02711.2000

Voorn, P., Vanderschuren, L. J. M. J., Groenewegen, H. J., Robbins, T. W., & Pennartz, C. M. A. (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences*, 27(8): 468-474 doi:10.1016/j.tins.2004.06.006

Wang, X-b., Bozdagi, O., Nikitczuk, J. S., Zhai, Z. W., Zhou, Q., & 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*, 105 (43): 19520-19525 doi:10.1073/pnas.0807248105

Wendler, E., Gaspar, J. C. C., Ferreira, T. L., Barbiero, J. K., Andreatini, R., Vital, M. A, B. F., Blaha, C. D., Winn, P., & Da Cunha, C. (2014). The roles of the nucleus accumbens core, dorsomedial striatum, and dorsolateral striatum in leaning: Performance and extinction of Pavlovian fear-conditioned responses and instrumental avoidance responses. *Neurobiology of Learning and Memory*, 109: 27-36 <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2013.11.009>

Wright, C.I., Beijer, A. V. J., & Groenewegen, H. J. (1996) Basal amygdaloid complex afferents to the rat nucleus accumbens are compartmentally organized. *The Journal of Neuroscience*, 16 (05): 1877–1893 doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-05-01877.1996

Yin, H.H., Knowlton, B.J., & Balleine, B.W. (2004). Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning.

European Journal of Neuroscience, 19: 181-189 doi:10.1046/j.1460-9568.2003.03095.x

Yin, H.H., Ostlund, S.B., Knowlton, B.J., & Balleine, B.W. (2005). The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. European Journal of Neuroscience, 22: 513-523 doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04218.x

Yin, H. H., Knowlton, B. J., & Balleine, B. W., (2006). Inactivation of dorsolateral striatum enhances sensitivity to changes in the action-outcome contingency in instrumental conditioning. Behavioural Brain Research, 166: 189-196 doi:10.1016/j.bbr.2005.07.012

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 doi: 10.1186/1756-6606-4-4