



VII encuentro  
Participación de la  
Mujer  
en la Ciencia



CENTRO DE INVESTIGACIONES  
EN ÓPTICA, A.C.



## EFFECTO DEL MIEDO CONDICIONADO SOBRE EL CIRCUITO EMOCIONAL AMÍGDALA MEDIAL-HIPOCAMPO

T. Molina-Jiménez<sup>a</sup>, A.G. Gutiérrez-García<sup>a,b</sup>, D.I. Vásquez-Hernández<sup>a</sup>, C.M. Contreras<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Neurofarmacología del Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz. México, [lorien586@hotmail.com](mailto:lorien586@hotmail.com), [dianai10@hotmail.com](mailto:dianai10@hotmail.com)

<sup>b</sup>Facultad de Psicología, Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz. México, [angutierrez@uv.mx](mailto:angutierrez@uv.mx)

<sup>c</sup>Unidad Periférica Xalapa, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Xalapa, Veracruz. México, [ccontreras@uv.mx](mailto:ccontreras@uv.mx)

### RESUMEN

Los núcleos amigdalinos y el hipocampo son estructuras del lóbulo temporal que mantienen conexiones recíprocas y están involucradas en la formación de la memoria emocional. La amígdala medial forma parte del complejo amigdalino y participa en el miedo condicionado, pero su participación es sólo parcialmente conocida. El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos del miedo condicionado sobre la conexión amígdala-hipocampo. Se utilizaron 15 ratas macho de la cepa Wistar divididas en 2 grupos (grupo control y grupo condicionado). El grupo condicionado fue sometido a un condicionamiento aversivo que consistió en asociar un choque eléctrico con un olor. Con la finalidad de determinar si existe un cambio en la responsividad de esta conexión, ambos grupos fueron sometidos a registro unitario extracelular del hipocampo, antes, durante y después de la estimulación eléctrica de la amígdala. Los resultados indicaron que la frecuencia neuronal del hipocampo fue mayor en el grupo condicionado; en este grupo predominaron las células que no respondieron (62%) a la estimulación eléctrica de la amígdala, las cuales tuvieron una mayor tasa de disparo con respecto al grupo control. En el grupo control predominaron las células que aumentaron su tasa de disparo neuronal (84%) ante la estimulación amigdalina, las cuales tuvieron una menor frecuencia neuronal en el grupo condicionado con respecto al grupo control. Concluimos que el condicionamiento aversivo generó una disminución en la responsividad del circuito emocional amígdala-hipocampo, en lo que podría ser una respuesta adaptativa que permite estrategias de afrontamiento basadas en el aprendizaje.

### INTRODUCCIÓN

Las experiencias emocionales, sean placenteras o aversivas, activan estructuras cerebrales que regulan la consolidación de memorias, como la amígdala y el hipocampo. La amígdala basolateral es una estructura del lóbulo temporal encargada de procesar reacciones autónomas y conductuales en presencia de objetos o situaciones con un significado emocional (McGaugh, 2004). Esta estructura tiene la capacidad de modular la memoria de eventos con carga afectiva, ante situaciones o estímulos relevantes, a través sus conexiones con el hipocampo, lo que en su conjunto permite la consolidación de las memorias emocionales (Richter-Levin y Akirav, 2003); entonces, existe una interacción entre la amígdala y el hipocampo, dado que la amígdala modula la codificación y el almacenamiento de memorias que dependen del hipocampo, mientras que éste último forma representaciones episódicas de un evento determinado para así poder influenciar a la amígdala a responder ante un estímulo no novedoso. A pesar de que la función del núcleo basolateral de la amígdala se ha relacionado más con el miedo condicionado y la formación de memorias aversivas, la evidencia reciente la incluye en el circuito anatómico del miedo condicionado (Li et al., 2004). Asimismo, al hipocampo se le ha relacionado con la respuesta condicionada, al permitir que ciertos estímulos contextuales lleven a la evocación de ciertas memorias relacionadas con la



experiencia previa (Robbins et al., 2008). Por lo tanto, la amígdala y el hipocampo permiten la generación de memorias con una carga emocional (Phelps, 2004), pero su participación en el miedo condicionado como un circuito relacionado anatómicamente es sólo parcialmente conocida.

## **MATERIAL Y METODOS**

### ***Sujetos***

Se utilizaron 15 ratas macho de la cepa Wistar de 3 meses de edad, con un peso de 300-350g, mismas que fueron colocadas en cajas de acrílico transparente (45 x 33 x 30 cm) que contenía aserrín. Las ratas se mantuvieron en un bioterio a temperatura ambiente (25 °C) y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 x 12 h (7:00 am a 7:00 pm). Todos los animales recibieron agua y alimento *ad libitum*. Se siguió de forma estricta el Manual de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

### ***Condicionamiento aversivo***

Los animales fueron colocados en una caja de acrílico de 30 cm x 25 cm de base y 30 cm de altura. La caja de acrílico, tuvo como piso una rejilla electrificada, las barras de la rejilla fueron de acero inoxidable con un diámetro de 0.5 cm y la separación entre una y otra barra fue de 1.3 cm. El piso electrificado estuvo conectado a un estimulador (Grass instruments S44) acoplado a una unidad de aislamiento (GRASS Instruments SIU5) y a una unidad de corriente constante (GRASS Instruments CCUIA) para la aplicación de choques eléctricos en las patas (0.6 mA, corriente directa, 1 seg, 16 min, 10 choques aleatorios) (Philips y LeDoux, 1992). La caja de acrílico fue colocada en el interior de una cámara sonoamortiguada (56 cm de ancho, 46 cm de alto y 40 cm de fondo) con un ventilador incluido que generó un ruido de fondo constante (alrededor de 30 dB). Inicialmente cada rata fue introducida en la caja de prueba durante 16 min para que se familiarizara con la situación (sesión de habituación). Veinticuatro horas más tarde retornó a la caja de acrílico durante 16 min, para la sesión de impregnación, esta vez las rejillas del piso de la caja fueron rociadas con 2-heptanona (0.4 ml). La tercera sesión se realizó 48 horas después de la primera sesión; en esta sesión, el animal fue colocado en la caja de acrílico donde recibió un condicionamiento aversivo hacia la 2-heptanona, es decir, la caja fue nuevamente impregnada con 2-heptanona (igual que en la sesión anterior), pero en esta ocasión las ratas recibieron simultáneamente choques eléctricos en las patas, durante 16 min. La caja de acrílico se limpió cuidadosamente después de cada sesión con solución dedorizante (0.5% de amoníaco, 15% de etanol, 10% de extran, 5% de isopropanol, 10% de pinol y 59.5% de agua).

### **Estudio electrofisiológico**

#### ***Cirugía estereotáxica***

Las ratas fueron anestesiadas con etil carbamato (uretano 1gr/kg i.p. SIGMA), anestesia que no interfiere con la actividad neuronal (Contreras et al., 1991). Luego, se le fijó la cabeza a un aparato estereotáxico (STOELTING), se realizó un corte en la piel para exponer el cráneo y visualizar la sutura de bregma, la cual fue el punto de referencia para localizar por medio de coordenadas estereotáxicas el acceso al hipocampo (AP= -6; L= -3.9, H= -2 a -3) y el núcleo de la amígdala medial (AP= -3, L= -3, H= -9). Asimismo, se realizaron dos trépanos para poder descender la micropipeta de vidrio y el electrodo de estimulación, respectivamente en las zonas antes mencionadas.

#### ***Registro unitario extracelular***

Para detectar la actividad neuronal en el hipocampo, la micropipeta se conectó a un preamplificador GRASS 7P511L, donde las señales registradas fueron enviadas a un amplificador 7P511K, después esta señal se envió en paralelo a un osciloscopio Tektronix TDS3052B (para su visualización) y a un estimulador GRASS S88 que convirtió la señal en pulsos cuadrados de amplitud y duración constantes (4V, 0.6 ms) dirigidos a una interfase



VII encuentro  
Participación de la  
Mujer  
en la  
Ciencia



(CED MICRO 1401; Cambridge Electronic Desing) que transformó la señal analógica en digital para procesar estadísticamente los datos con el programa Spike2.

#### **Estimulación eléctrica**

El electrodo de estimulación colocado en el núcleo medial de la amígdala (-9 mm a partir de la superficie de la corteza cerebral) estuvo acoplado a un estimulador (GRASS S48). La estimulación fue de 1 minuto (pulsos cuadrados de 1ms, 0.3 pulsos/seg, durante 1 min).

#### **Control histológico del estudio electrofisiológico**

El sitio de registro fue marcado utilizando una bomba de corriente (DAGAN®) durante 20 minutos a través de la micropipeta. El sitio de estimulación se marcó dejando pasar corriente directa a través del electrodo de estimulación durante 30 segundos. Luego los animales fueron perfundidos por vía intracardiaca (ventrículo izquierdo) con 200 ml de solución salina 0.9% y después con 200 ml de formaldehído al 30%. Posteriormente, se extrajeron los cerebros y se colocaron en 30 ml de formaldehído por 48 h. Luego, los cerebros fueron congelados (-20 °C) y seccionados (40 micras) con un microtomo (Criostato Leica CN 1510S) y teñidos (técnica de Nissl) para la verificación histológica del sitio de registro.

#### **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de 2 vías, teniendo como factor A, a los grupos experimentales (control y condicionado) y como factor B, los periodos periesímulo (basal y post-estimulo, un minuto cada uno). El análisis de datos se realizó empleando un análisis de base 1000 ms. Se obtuvo el valor de la frecuencia de disparo de cada célula hipocampal durante 20 estímulos aplicados a la amígdala medial. Esta forma de análisis permitió identificar algún cambio en alguna posible respuesta polisináptica y determinar así, la funcionalidad polisináptica de la conexión amigdalino-hipocampo en la forma de posdescargas, ya que se analizaron 1000 ms antes y 1000 ms después de la estimulación. Se utilizó el programa de SigmaStat versión 3.5 y sólo se aceptaron como diferencias significativas, aquellas que alcanzaron  $p \leq 0.05$ . Los datos se representan como la media  $\pm$  el error estándar.

#### **RESULTADOS**

Se registró un total de 68 células, de las cuales 31 células fueron del grupo control y 37 del grupo condicionado. El rango de profundidad de registro de los grupos fue de -3.6 mm a -3.4 mm por debajo de la corteza cerebral.

#### **Estudio electrofisiológico del hipocampo: Frecuencia de disparo neuronal del hipocampo.**

El ANOVA de 2 vías indicó en el factor A diferencias significativas entre los grupos [ $F(1,132) = 16.48$ ,  $p < 0.001$ ]. El análisis *pos hoc* Student-Newman-Keuls (SNK) indicó que la tasa de disparo neuronal del grupo condicionado fue mayor en comparación con la del grupo control. En cuanto al factor periodo no existieron diferencias significativas en la actividad neuronal del hipocampo posterior a la estimulación al compararla con la frecuencia basal [ $F(1,132) = 0.001$ ,  $p = 0.97$ , NS]. La interacción de los factores no fue significativa [ $F(1,132) = 0.05$ ,  $p < 0.81$ , NS].

#### **Clasificación de células del hipocampo dependiendo del tipo de respuesta ante la estimulación eléctrica de la amígdala medial.**

Se clasificaron a las células registradas del hipocampo por el tipo de respuesta ante la estimulación eléctrica del núcleo medial de la amígdala, siendo las células que aumentaron su tasa de disparo ante la estimulación eléctrica de la amígdala medial (células +) las más predominantes en el grupo control (células +, 84%; células Ø, 13%). Por el contrario, en el grupo condicionado, el porcentaje se invirtió, dado que las células que no respondieron ante dicha estimulación (células Ø) fueron más abundantes en comparación con las células + (células +, 28%; células Ø, 62%). El porcentaje de las células que no respondieron fue tan bajo que impidió su análisis estadístico.



### **Células + del hipocampo**

El ANOVA de 2 vías mostró diferencias significativas entre los grupos [ $F(1,70) = 5.22, p < 0.02$ ]. El análisis *pos hoc* SNK indicó que la actividad neuronal de las células + del hipocampo en el grupo condicionado fue menor en comparación con el grupo control. Se encontraron diferencias en el factor periestímulo [ $F(1,70) = 13.67, p < 0.001$ ]. El análisis *post hoc* SNK, indicó que la actividad neuronal del hipocampo fue mayor ( $p < 0.05$ ) después de la estimulación eléctrica de la amígdala medial con respecto a la actividad neuronal previa al estímulo eléctrico, lo que es atribuible al tipo de respuesta que tuvieron ante la estimulación eléctrica. La interacción no fue significativa [ $F(1,70) = 0.27, p = 0.60, NS$ ].

### **Células Ø del hipocampo**

El ANOVA de 2 vías mostró diferencias significativas entre los grupos [ $F(1,50) = 5.08, p < 0.02$ ]. El análisis *pos hoc* SNK indicó que en el grupo condicionado las neuronas Ø tuvieron una mayor actividad neuronal en comparación con el grupo control. Como era de esperarse, en el factor periestímulo no existieron diferencias significativas [ $F(1,50) = 0.10, p = 0.74, NS$ ]. La interacción entre factores tampoco fue significativa [ $F(1,50) = 0.007, p = 0.93, NS$ ].

## **DISCUSIÓN**

El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos del miedo condicionado sobre la conexión amígdala-hipocampo. Nuestros resultados demuestran que el condicionamiento aversivo aumentó la tasa de disparo neuronal del hipocampo, específicamente en células que no tienen conexión con el núcleo medial de la amígdala (células Ø). Esto es consistente con otras observaciones que han reportado que el estrés genera niveles elevados de corticosterona en plasma (Dallman et al., 1987), ya que altos niveles de corticosterona alteran las propiedades de las células hipocámpales y aumentan la frecuencia de los potenciales posinápticos excitatorios de las células piramidales CA1 y la probabilidad de liberación de glutamato, por lo tanto, una mayor excitabilidad neuronal (Karts et al., 2005; Olijslagers et al., 2008), lo que también se observa en las ratas condicionadas (estímulo auditivo asociado a choques), en las que aumenta la excitabilidad de las sinapsis de las dendritas colaterales Schaffer de CA1 (Sacchetti et al., 2001) y aumenta la tasa de disparo neuronal de células CA1 ante la presencia del estímulo condicionado (Gilmartin y McEchron, 2005). Llama la atención en nuestro estudio, que en el grupo condicionado predominaran las células sin respuesta a la estimulación amigdalina (células Ø: 62%), lo que sugiere que estas neuronas están conectadas con otras estructuras, tal vez núcleos amigdalinos relacionados con el circuito de aprendizaje asociativo (memoria emocional) como el núcleo lateral y basolateral de la amígdala, directamente involucrados en el miedo condicionado (LeDoux, 2000). De ser el caso, después del evento aversivo la vía amígdala basolateral-hipocampo predominó sobre la vía amígdala medial-hipocampo, la cual está mayormente involucrada en memorias sociales y no de miedo, una hipótesis que tendrá que ser verificada. La tasa de disparo de las células + del grupo que fue sometido a un condicionamiento aversivo fue menor a la del grupo control e inclusive hubo un decremento del porcentaje de estas células en el grupo condicionado (28%) en comparación con el del grupo control (84%). Esto quizá se deba a la participación de la amígdala medial en varias conductas sociales que dependen de señales químicas, como la conducta maternal, la agresiva y las reproductivas, entre otras (Fleming et al., 1995; Ferguson et al., 2002), más que con el miedo y la ansiedad. Aún así, es posible sugerir que las células + tuvieron una menor responsividad al estímulo eléctrico, ya que los animales fueron sometidos a un condicionamiento aversivo, lo cual implica la formación de memorias aversivas (LeDoux, 2000).

Dado que el condicionamiento aversivo generó una disminución en la responsividad del circuito emocional amígdala-hipocampo, concluimos que podría tratarse de la base funcional de la elaboración de una respuesta adaptativa, es decir, el origen de estrategias eficaces de afrontamiento basadas en el aprendizaje y que conducen a la supervivencia del individuo, al establecer comparaciones entre las experiencias vividas y las situaciones actuales, en un contexto apoyado en la memoria emocional.



\*Agradecimiento: Donativo CONACyT (CB-2006-1, 61741); Beca CONACyT de posgrado para TMJ-205773 y DIVH-235961; y, SNI 32755-AGGG y 754-CMC.

## BIBLIOGRAFÍA

1. C.M. Contreras, M.L. Marván, H. Lara-Morales, A. Barradas, L. Cachón, M.A. Guzmán-Sáenz, C. Márquez Flores, "Clomipramine actions on firing rate in septal nuclei of the rat are not related to anaesthesia (urethane)", *Bol. Estud. Med. Biol.* Vol. 39, 1-4, 1991, pp. 3-8.
2. M.F. Dallman, S.F. Akana, L., Jacobson, N., Levin, C.S. Cascio, J. Shinsako, "Characterization of corticosterone feedback regulation of ACTH secretion", *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, Vol. 512, 1987, pp. 402-414.
3. J.N. Ferguson, L.J. Young, T.R. Insel, "The neuroendocrine basis of social recognition", *Front. Neuroendocrinol.*, Vol. 23, 2, 2002, pp. 200-224.
4. A.S. Fleming, E.J. Suh, M. Korsmit, B. Rusak, "Activation of Fos-like immunoreactivity in the medial preoptic area and limbic structures by maternal and social interactions in rats", *Behav. Neurosci.*, Vol. 108, 4, 1994, pp. 724-734.
5. M.R. Gilmartin, M.D. McEchron, "Single neurons in the dentate gyrus and CA1 of the hippocampus exhibit inverse patterns of encoding during trace fear conditioning", *Behav. Neurosci.*, Vol. 119, 2005, pp 164-179
6. H. Karst, S. Berger, M. Turiault, F. Tronche, G. Schütz, M. Joëls, "Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 102, 52, 2005, pp. 19204-19207.
7. J.E. LeDoux, "Emotion circuits in the brain", *Annu. Rev. Neurosci.*, Vol. 23, 2000, pp. 115-184.
8. C.I. Li, T.L. Maglinao, L.K. Takahashi, "Medial amygdala modulation of predator odor-induced unconditioned fear in the rat", *Behav. Neurosci.*, Vol. 118, 2, 2004, pp. 324-332.
9. J.L. McGaugh, "The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences", *Annu. Rev. Neurosci.*, Vol., 27, 2004, pp. 1-28.
10. J.E. Olijslagers, E.R. de Kloet, Y. Elgersma, G.M. van Woerden, M. Joëls, H. Karst, "Rapid changes in hippocampal CA1 pyramidal cell function via pre- as well as postsynaptic membrane mineralocorticoid receptors", *Eur. J. Neurosci.*, Vol. 27, 10, 2008, pp. 2542-2550.
11. E.A. Phelps, "Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex", *Curr. Opin. Neurobiol.*, Vol. 14, 2, 2004, pp. 198-202.
12. R.G. Phillips, J.E. LeDoux, "Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning", *Behav. Neurosci.*, Vol., 106, 2, 1992, pp. 274-285.
13. G. Richter-Levin, I. Akirav, "Emotional tagging of memory formation--in the search for neural mechanisms", *Brain Res. Rev.*, Vol. 43, 3, 2003, pp. 247-256.
14. T.W. Robbins, K.D. Ersche, B.J. Everitt, "Drug addiction and the memory systems of the brain", *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, Vol. 1141, 2008, pp. 1-21.
15. B. Sacchetti, C.A. Lorenzini, E. Baldi, C. Bucherelli, M. Roberto, G. Tassoni, M. Brunelli, "Long-lasting hippocampal potentiation and contextual memory consolidation", *Eur. J. Neurosci.*, Vol. 13, 12, 2001, pp. 2291-2298.