

UNIVERSIDAD JAIME I
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
MÁSTER EN INVESTIGACIÓN EN CEREBRO Y CONDUCTA

**“EVALUACIÓN DE UN MODELO DE
ADQUISICIÓN Y EXTINCIÓN DE MIEDO
CONDICIONADO AL CONTEXTO”**

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

AUTORA: Mónica Navarro Sánchez

DIRECTORES: Isis Gil Miravet y Francisco Olucha Bordonau

Castellón, 14 de julio de 2021

Índice

Resumen	0
1. Introducción.....	1
2. Materiales y Métodos	2
1. Sujetos.....	2
2. Cámaras de condicionamiento	2
3. Estereotaxia.....	2
4. Test conductuales.....	2
Protocolo 1: Extinction within several days.....	2
Protocolo 2: Extinction within a day	2
5. Medidas de freezing.....	3
6. Análisis de datos	3
3. Resultados	3
1. Experimento 1: Estableciendo protocolo de fear conditioning.....	3
2. Ampliación de la muestra	4
3. Experimento 2. AAV– CAG:R3I5–GPF	6
4. Discusión.....	7
5. Conclusión.....	8
6. Bibliografía.....	9

Resumen

La memoria del miedo forma parte de la respuesta adaptativa típica. Sin embargo, los recuerdos de miedo desregulados pueden ser la base de los estados de ansiedad. El miedo condicionado al contexto (CxFC) se ha utilizado para reproducir algunos de los acontecimientos que conducen al desarrollo de estos trastornos. Varias áreas cerebrales asociadas con la cognición y la emoción se han relacionado con el CxFC, incluyendo el hipocampo y la corteza retrosplenial (RSC). Nuestra hipótesis es que aspectos específicos del proceso de CxFC están mediados por proyecciones moduladoras de estructuras subcorticales. Nuestro objetivo es establecer un modelo experimental en el que estos aspectos presenten un marco estadísticamente robusto para comprobar la implicación de las proyecciones subcorticales. En este estudio en ratas adultas evaluamos dos modelos experimentales, siendo la diferencia entre ellos el si las sesiones de extinción se realizaban en el mismo día o en dos días diferentes, además examinamos el efecto de la manipulación del RSC sobre el condicionamiento contextual del miedo CxFC, ya que este centro recibe proyecciones específicas de relaxina3 desde el núcleo pontino incertus. Los resultados sugieren que el modelo experimental “extinction within several days” refleja mejor los procesos de adquisición y extinción del miedo. Como resultados preliminares, observamos que los animales en los que se inyectó en el RSC una partícula AAV que expresaba constitutivamente el agonista de relaxina3 R3I5 mostraban un proceso adecuado de adquisición, pero no de extinción del CxFC. En conjunto, los presentes hallazgos establecen parámetros procedimentales y conductuales que son susceptibles de análisis de sistemas neurales de tres resultados clínicamente relevantes del condicionamiento del miedo: adquisición, mantenimiento y resistencia a la extinción.

Palabras Clave: Condicionamiento del miedo al contexto; córtex retrosplenial; freezing; rata; relaxina3

Abstract

Fear memory is part of the typical adaptive response. However, dysregulated fear memories can be the basis of anxiety states. Context-conditioned fear (CxFC) has been used to replicate some of the events that lead to the development of these disorders. Several brain areas associated with cognition and emotion have been linked to CxFC, including the hippocampus and the retrosplenial cortex (RSC). We hypothesize that specific aspects of the CxFC process are mediated by modulatory projections from subcortical structures. Our aim is to establish an experimental model in which these aspects present a statistically robust framework for testing the involvement of subcortical projections. In this study in adult rats, we evaluated two experimental models, with the difference between them being whether the extinction sessions were performed on the same day or on two different days, additionally we examined the effect of RSC manipulation on contextual fear conditioning CxFC, as this center receives specific relaxin3 projections from the pontine nucleus incertus. The results suggest that the extinction between days experimental model better reflects the processes of fear acquisition and extinction. As preliminary results, we observed that animals in which an AAV particle expressing constitutively the relaxin3 agonist R3I5 was injected into the RSC showed an adequate process of acquisition but not extinction of CxFC. Taken together, the present findings establish procedural and behavioural parameters that are amenable to neural systems analysis of three clinically relevant outcomes of fear conditioning: acquisition, maintenance and resistance to extinction.

Keywords: Contextual fear conditioning; freezing; rat; relaxin3; retrosplenial cortex

Abreviaturas: CR, Respuesta condicionada (conditioned response); CS, estímulo condicionado (conditioned stimulus); CxFC, Context fear conditioning; PostAc1, periodo posterior al primer shock; PostAc2, periodo posterior al segundo shock; PreAc1, periodo previo al primer shock; PreAc2, periodo previo al segundo shock; RSC, Córtex retrosplenial; T1, Primera prueba de extinción; T2, Segunda prueba de extinción; T3, Tercera prueba de extinción; T4, Cuarta prueba de extinción; T5, Quinta prueba de extinción; TEPT, Trastorno de estrés post-traumático; US: Estímulo incondicionado (unconditioned stimulus)

1. Introducción

La memoria del miedo forma parte de la respuesta adaptativa típica. Sin embargo, los recuerdos del miedo desregulados pueden ser la base de estados de ansiedad como el trastorno de estrés postraumático (TEPT) (Stansley et al., 2018). El miedo condicionado al contexto (*context fear conditioning* CxFC), ha sido utilizado para replicar alguno de los eventos que conducen al de trastornos basados en el miedo, como el TEPT (Chaaya et al., 2019).

Los ejemplos más conocidos de condicionamiento se centran en los estímulos condicionales discretos. Sin embargo, también hay señales contextuales estáticas que están presentes continuamente durante toda la experiencia de condicionamiento (Fanselow, 2010). El CxFC es un protocolo de condicionamiento Pavloviano, en el que un animal es situado en un contexto (estímulo condicionado, *conditioned stimulus*, CS), en el que se le administra un estímulo nocivo, normalmente un shock eléctrico a través de las patas (estímulo incondicionado, *unconditioned stimulus* US). La respuesta condicionada (*conditioned response*, CR) de paralización (*freezing*) puede ser utilizada para estudiar el grado de adquisición de esta memoria implícita (LeDoux, 2014; Majchrzak et al., 2006).

Cabe señalar que las señales contextuales no parecen seguir las mismas reglas que los estímulos discretos. Al contrario que en el condicionamiento con estímulos discretos, en el condicionamiento contextual, cuanto más largo es el intervalo entre CS y el US, mejor es el condicionamiento (Fanselow, 2010). Esto posiblemente sea debido a que en el condicionamiento contextual los rasgos polimodales del contexto deben vincularse como una representación unificada. Por ello es de vital importancia la acción del hipocampo (Fanselow, 2010; Majchrzak et al., 2006). Por ejemplo, el córtex retrosplenial (RSC) proporciona una importante fuente de información sensorial visoespacial al sistema de memoria del hipocampo en primates y

roedores, a través de cuyas conexiones puede contribuir a las funciones dependientes del hipocampo, incluyendo el aprendizaje y la memoria espacial y contextual, influyendo quizás en el aprendizaje configuracional y el procesamiento de la información en el hipocampo (Robinson et al., 2018).

Como evidencian en su artículo Bernier et al. (2017), el giro dentado del hipocampo se ha convertido en un locus crítico de plasticidad cerebral, con relevancia en la memoria, trastornos depresivos y de ansiedad. Es más, son varios los estudios que indican que la lesión de esta área produce un deterioro en la adquisición de memorias (Bernier et al., 2017). El hipocampo también ha mostrado tener un papel en la extinción (Bernier et al., 2017) y expresión de estas memorias de miedo (Sierra-Mercado et al., 2011).

La distinción entre estímulos nocivos, neutros y beneficiosos dotan al organismo de su capacidad de adaptación al medio. Las señales que antes eran amenazantes pueden, de hecho, no ser contingentes con el US, en dicho caso, se genera una nueva memoria de extinción según la cual las señales no indican la inminencia de un suceso nocivo para que el organismo pueda dedicarse a otros comportamientos adaptativos (Sangha et al., 2020). A pesar de su profunda investigación, los mecanismos para distinguir la seguridad frente al miedo siguen sin estar claros y sus circuitos neuronales continúan siendo cartografiados (Sangha et al., 2020). El estudiado circuito del cerebro anterior, que comprende la amígdala, el córtex prefrontal medial y el hipocampo, ha sido el centro de gran parte de la investigación sobre la regulación de las respuestas al miedo (LeDoux, 2014; Sangha et al., 2020). Sin embargo, estructuras troncoencefálicas podrían participar también en procesos relacionados con la configuración del CxFC (Pereira et al., 2013; Szőnyi et al., 2019).

Se plantea la hipótesis de que aspectos concretos del proceso de adquisición, retención, recuperación y extinción del miedo condicionado a contexto están mediados por

proyecciones moduladoras desde estructuras subcorticales.

Los objetivos que derivan de esta hipótesis son los de fijar un modelo experimental en el que los aspectos de adquisición, retención y extinción del miedo condicionado a contexto presenten un marco estadísticamente robusto para poder ensayar la participación de proyecciones subcorticales en cada uno de esos procesos.

2. Materiales y Métodos

1. Sujetos

Se han utilizado 32 ratas Wistar adultas (17 hembras, 241-306 gr y 15 machos, 416-598 gr, siendo machos y hembras del mismo rango de edad). Fueron alojadas por parejas del mismo sexo en jaulas de plástico, en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 (de 8 AM a 20 PM) en una sala con humedad y temperatura controlada y adecuada para la especie. Se les proporcionó comida y agua ad libitum. Todos los experimentos fueron realizados durante la fase de luz.

2. Cámaras de condicionamiento

Los animales fueron transportados a la sala de condicionamiento en sus jaulas. El condicionamiento tenía lugar en cajas de condicionamiento individuales de 28x21x21 cm con tres paredes con un patrón plastificado de líneas verticales blancas y negras, puerta y techo de plexiglass transparente y suelo de barras horizontales de acero inoxidable uniformemente espaciadas por donde se suministraban shocks eléctricos de 0,3 mA de 0,5s de duración. Estas cajas de condicionamiento estaban en el interior de cajas de atenuación de sonido y luz, con una apertura en el techo donde se colocaba la cámara para grabar las sesiones.

Los aparatos fueron limpiados previa y posteriormente a cada animal con etanol 30%.

3. Estereotaxia

Los sujetos fueron anestesiados con isoflurano (1,5 - 2% en oxígeno) y colocados en un aparato estereotáxico. Se separó la piel y se perforaron agujeros en el cráneo

dirigiéndose al córtex retrosplenial en coordenadas estereotáxicas relativas al bregma: AP -6.5 mm, ML \pm 0.8 mm, DV -2.2 mm (Fournier et al., 2019). 6 ratas recibieron infusiones bilaterales de 0.75 μ L de la partícula AAV^{1/2}-sCAG:R3/I5-IRES-eGPF en las mencionadas coordenadas estereotáxicas (Ver Ilustración 1).

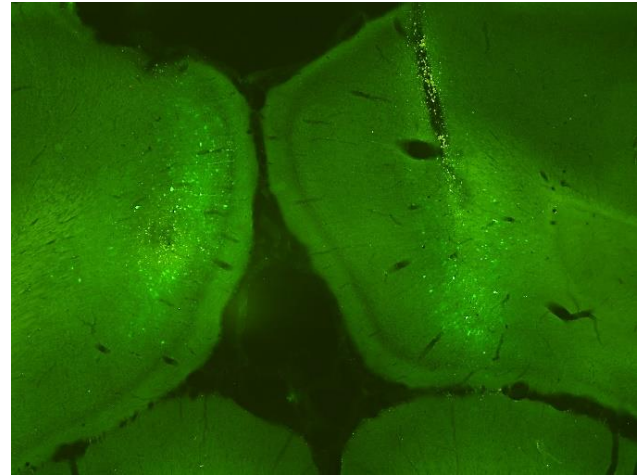


Ilustración 1 Inyección bilateral en córtex retrosplenial (AP -6.5 mm, ML \pm 0.8 mm, DV -2.2 mm) partícula AAV1/2-sCAG:R3/I5-IRES-eGPF

4. Test conductuales

Protocolo 1: Extinction within several days

El condicionamiento se dividía en 6 sesiones de 10 min (2 sesiones de adquisición y 4 sesiones de extinción) repartidas en 3 días. En la primera sesión del día 1, los animales recibieron un shock eléctrico tras 4 min en la caja de condicionamiento, en la segunda sesión el shock se aplicaba a los 6 min. El día 2, se volvió a llevar a los animales a la caja de condicionamiento para las sesiones de extinción 1 y 2 en las que los animales eran introducidos en las cajas con el mismo contexto, pero sin recibir ningún shock. El día 3 se repitió el mismo procedimiento que el día 2 para las sesiones de extinción 3 y 4. Todas las sesiones llevadas a cabo en un mismo día se realizaron con 4H de separación una de la otra.

Protocolo 2: Extinction within a day

Al igual que en el protocolo anterior, en la primera sesión del día 1 los animales

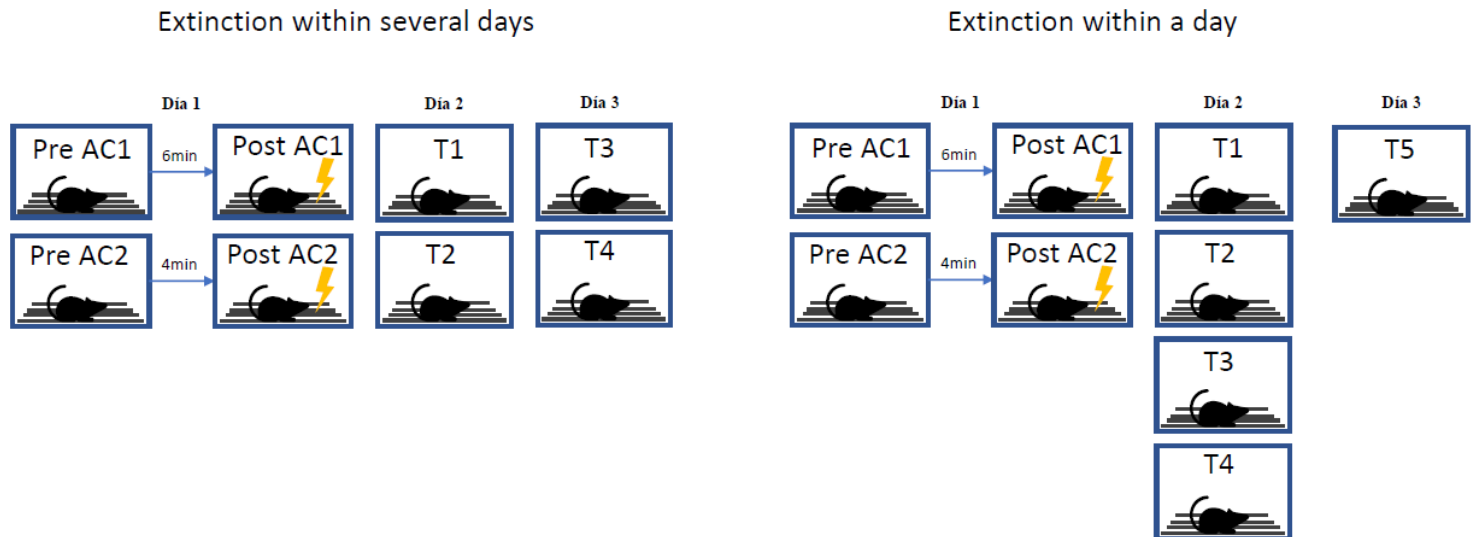


Ilustración 2 Esquema tests conductuales

recibieron un shock eléctrico tras 4 min en la caja de condicionamiento, en la segunda sesión el shock se aplicaba a los 6 min de estar el animal en la caja. En el día 2 se volvió a llevar a los animales a la caja de condicionamiento para las sesiones de extinción de 1 a 4 en las que los animales eran introducidos en las cajas con el mismo contexto, pero sin recibir ningún shock. Estas sesiones se realizaron con 1h de separación entre ellas. En el día 3, los animales volvieron a ser introducidos en las cajas de condicionamiento durante 10 minutos sin recibir ningún shock.

5. Medidas de freezing

La conducta de los animales fue grabada mediante una webcam situada en el techo de las cajas de condicionamiento, utilizando el programa OBS estudio.

Los vídeos de cada una de las sesiones de los tests conductuales fueron importados al software de video ANY-Maze (Stoelting Europe, Dublin) para medir el nivel de freezing utilizando un umbral de 0,3. El miedo contextual, la generalización y la sensibilización se cuantificaron como el porcentaje de tiempo que el animal pasó en freezing en la caja de condicionamiento.

6. Análisis de datos

Los vídeos obtenidos fueron analizados en su totalidad y divididos en periodos de 2 minutos. Las medidas de freezing obtenidas se plasmaron en forma de porcentajes en una base de datos del programa de análisis estadístico GraphPad Prism (Software Inc, La Jolla, CA, USA). A partir de esta se realizaron ANOVAs bidireccionales, seguidas de análisis post hoc de Tukey. El valor de α fue fijado en 0,05 para todos los análisis.

3. Resultados

1. Experimento 1: Estableciendo protocolo de fear conditioning

En primer lugar, tratamos de discriminar cuál de los dos protocolos de condicionamiento planteados, reflejaba mejor el patrón de adquisición y extinción del miedo.

Los animales de ambos protocolos siguieron las mismas pautas de adquisición del miedo, es decir, una primera sesión con shock a los 4 minutos y una segunda sesión con shock a los 6 minutos. En el protocolo “extinction within several days” las sesiones de extinción se realizaron en dos días diferentes, mientras que en el protocolo “extinction within a day” las sesiones de extinción fueron realizadas todas en un mismo día.

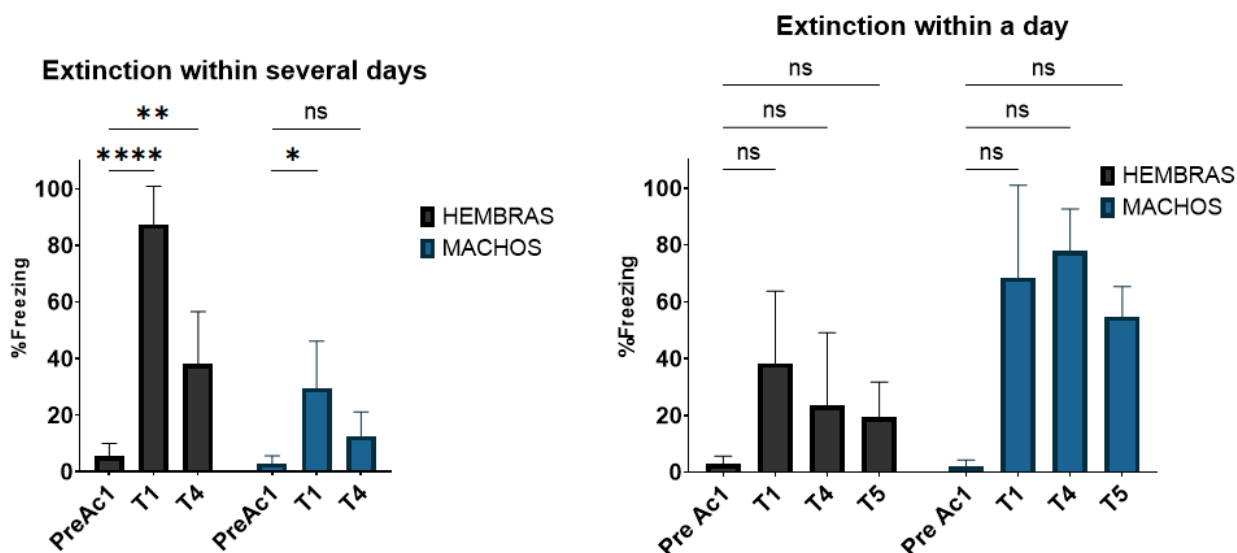


Ilustración 3 Análisis de la adquisición de condicionamiento contextual en los 2 protocolos evaluados. Datos segregados por sexo del animal. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0,0001$

La normalidad de las medidas obtenidas ha sido analizada mediante los tests de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, superando todos los grupos los tests de normalidad.

El tiempo total de los tests de extinción representados en la Ilustración 3. es de 4 min, al igual que el tiempo previo al shock en la primera sesión de adquisición (PreAC1).

En la Ilustración 3 se puede observar que los animales del protocolo “extinction within several days” muestran patrones de adquisición y extinción más consistentes que los animales del protocolo “extinction within a day”.

El resultado de la ANOVA muestra un efecto del bloque de ensayos ($F_{2, 12} = 42,80$; $p = < 0,0001$) así como un efecto individual del sujeto ($F_{1, 6} = 59,04$; $p = 0,0003$) y un efecto de combinación ($F_{2, 6} = 27,56$; $p = 0,0009$). El análisis post hoc de Tukey confirmó la existencia de diferencias significativas entre el porcentaje de freezing de PreAC1 y la primera sesión de extinción en ambos grupos (T1). Indicando una correcta adquisición del condicionamiento de miedo.

En cuanto a la extinción, se encontraron diferencias significativas entre PreAC1 y la última sesión de extinción (T4) en hembras,

pero no en machos. Indicando que, a pesar de un evidente efecto de extinción, en el grupo de las hembras no llega a conseguirse una extinción completa como sucede en el grupo de los machos. Este efecto también puede verse afectado por los elevados valores de variabilidad entresujetos.

En cuanto a los resultados del protocolo “extinction within a day”, en ninguno de los conjuntos de datos graficados se cumple el supuesto de esfericidad de la muestra, por lo que se aplica la corrección épsilon de Greenhouse-Geisser (ϵ) a las medidas de ANOVA.

El resultado de la ANOVA corregida muestra un efecto del bloque de ensayos ($F_{1,680, 8,399} = 10,08$; $p = 0,0071$) y un efecto individual del sujeto ($F_{1,000, 5,000} = 15,55$; $p = 0,0109$). El análisis post hoc no evidenció diferencias significativas entre los ensayos comparados. Por lo que no se observa un patrón de adquisición y extinción a nivel estadístico ni en hembras ni en machos.

2. Ampliación de la muestra

Una vez establecido el protocolo que mejor instaura los procesos de adquisición y extinción optamos por ampliar la muestra para conseguir resultados más rigurosos. Se añadieron 10 animales (4 hembras y 6 machos) a la muestra de 11 sujetos (7

Evaluación de un modelo de adquisición y extinción de miedo condicionado al contexto

hembras y 4 machos) utilizados en el experimento 1. Haciendo un total de 21 animales (11 hembras y 10 machos).

El resultado de la ANOVA muestra un efecto individual del sujeto ($F_{1, 20} = 17,11$; $p = 0,0005$) y un efecto de combinación ($F_{7, 139} = 3,789$; $p = 0,0009$), los resultados relativos al bloque de ensayos no cumplen el supuesto de esfericidad de la muestra, por lo que se aplica la corrección épsilon de Greenhouse-Geisser (ϵ) a las medidas de ANOVA. El resultado de la ANOVA corregida muestra un efecto del bloque de ensayos ($F_{3,295, 65,42} = 26,45$; $p < 0,0001$).

Analizando en detalle los datos relativos a la extinción en el grupo de las hembras, podemos observar que, a pesar de no producirse una extinción completa, ya que PreAc1 y el último test de extinción (T4) siguen siendo estadísticamente distintos, se

En la Ilustración 4 se puede observar que los análisis post-hoc de Tukey muestran una adecuada adquisición del condicionamiento contextual de miedo tanto en hembras como en machos, que se evidencia en el grupo de las hembras por las diferencias estadísticamente significativas en el % de freezing entre el periodo previo al primer shock (PreAc1) y el periodo posterior al primer shock (PostAc1), periodo posterior al segundo shock (Post Ac2) y primer test de extinción (T1). Y en el grupo de los machos por las diferencias significativas de PreAc1 con PostAc2 y T1.

puede observar un efecto de extinción inter días, observándose una reducción de los niveles de freezing con respecto a T1 en T3 pero no en T2 (realizado el mismo día que T1).

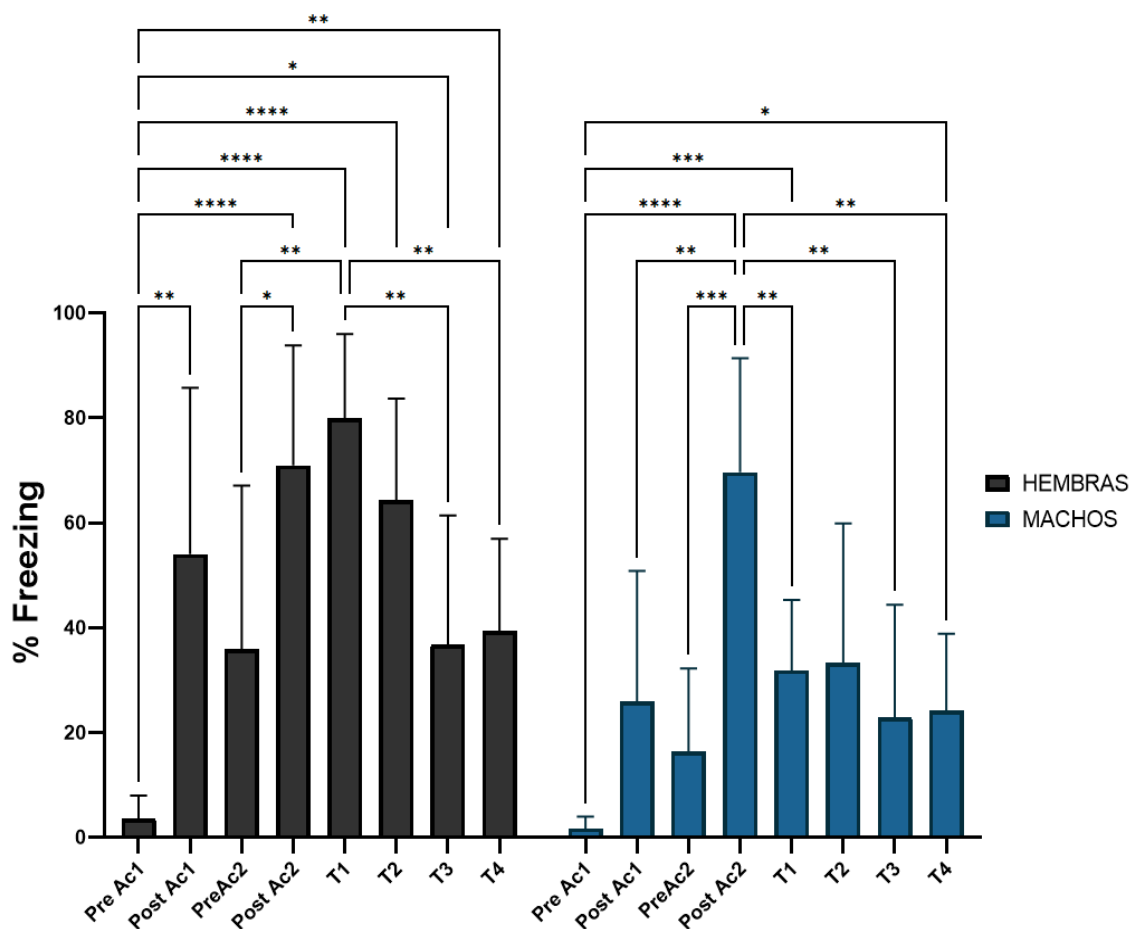


Ilustración 4 Análisis de la adquisición de condicionamiento contextual protocolo "extinction within several days". Datos segregados por sexo del animal. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,0005$; **** $P < 0,0001$

Evaluación de un modelo de adquisición y extinción de miedo condicionado al contexto

En cuanto al grupo de los machos, podemos observar en la Ilustración 4 que el proceso de extinción no se ha producido como

se esperaba, ya que hay una reducción abrupta de los niveles de freezing en T1, que se mantiene sin diferencias significativas en el resto de las pruebas de extinción (T2, T3 y T4). Adicionalmente, en la Ilustración 5 observamos diferencias significativas entre machos y hembras primordialmente en la adquisición del CxFC. El resultado de la ANOVA muestra un efecto del bloque de ensayos ($F_{7, 139} = 26,45$; $p < 0,0001$) así como un efecto individual del sujeto ($F_{1, 20} = 17,11$; $p = 0,0005$) y un efecto de combinación ($F_{7, 139} = 3,789$; $p = 0,0009$).

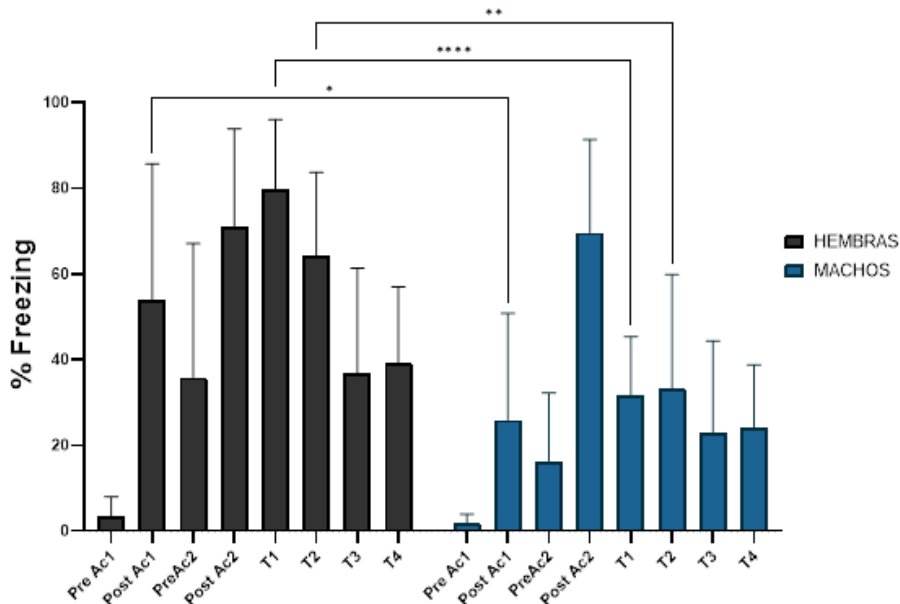


Ilustración 5 Análisis de las diferencias de género en CxFC siguiendo el protocolo 1. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0,0001$

3. Experimento 2. AAV-CAG:R3I5-GFP

Se realizaron test conductuales a 3 animales inyectados una partícula AAV que expresa constitutivamente el agonista de relaxina3, R3I5 y 3 controles siguiendo el protocolo 1. Los resultados preliminares representados en Ilustración 6 mostraron que, a diferencia de los controles, los animales operados mostraron un proceso adecuado de adquisición, pero no de extinción de CxFC.

El resultado de la ANOVA indica un efecto del bloque de ensayos ($F_{7, 28} = 4,145$; $p = 0,0030$), del sujeto ($F_{1, 4} = 0,4166$; $p = 0,5538$) y un efecto de interacción ($F_{7, 28} = 4,145$; $p = 0,0030$).

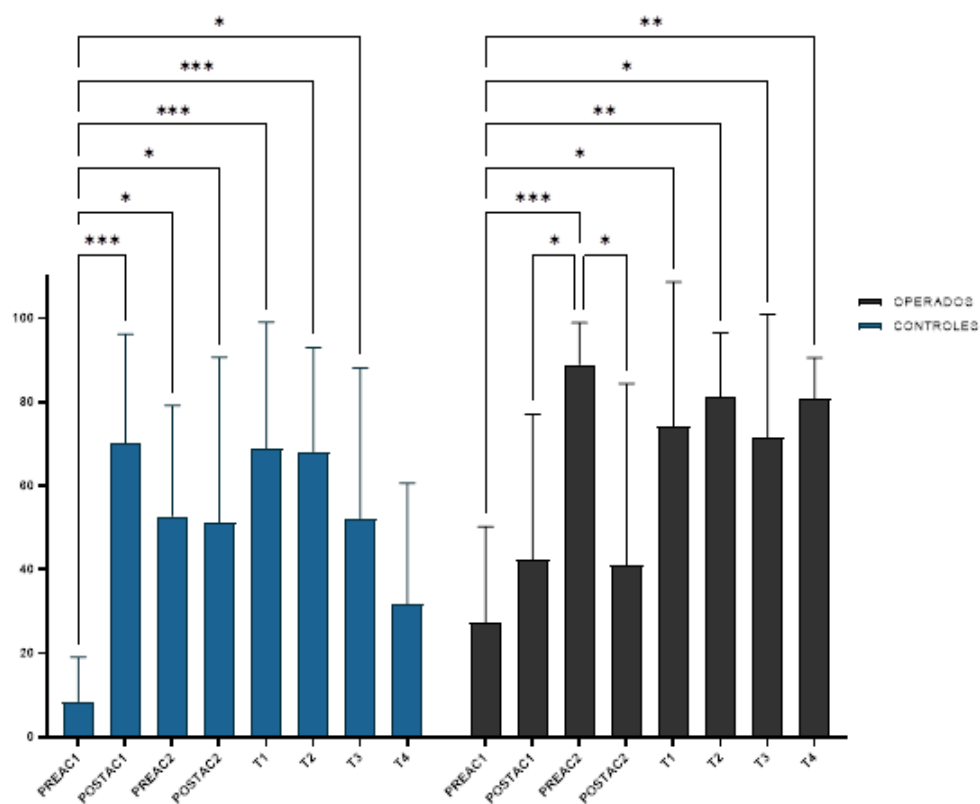


Ilustración 6 Análisis CxFC animales con inyección de una partícula AAV expresando constitutivamente el agonista de relaxina3, R3I5 en RSC vs naïve. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0,0005$

4. Discusión

El presente estudio tenía como objetivo fijar un modelo experimental en el que los aspectos de concretos del miedo condicionado al contexto presenten un marco estadísticamente robusto para poder ensayar la participación de proyecciones subcorticales en estos procesos.

Los resultados indican que, para llevar a cabo un condicionamiento de miedo al contexto, el protocolo que brinda resultados de mayor robustez estadística, a pesar de no alcanzar una extinción completa, es el "extinction within several days", en el que las sesiones de extinción se realizan en dos días diferentes.

En la literatura previa se describen diferentes enfoques a la hora de establecer un condicionamiento de miedo al contexto, en todos los estudios revisados se utiliza como US shocks eléctricos administrados a través del suelo de la caja de condicionamiento, con gran diversidad en cuanto a duración, intensidad y número de shocks. La mayoría de estudios revisados emplean una mayor intensidad del shock eléctrico, medido en miliamperios (mA) y/o mayor duración del mismo, medida en segundos (s) y mayor número de shocks (Bae et al., 2015; Baldi & Bucherelli, 2014; Bernier et al., 2017; Chaaya et al., 2019; Majchrzak et al., 2006; Poulos et al., 2016; Robinson et al., 2018; Sierra-Mercado et al., 2011; Stansley et al., 2018) alcanzando niveles de freezing tras la adquisición del CxFC semejantes a los obtenidos en el presente estudio, aunque cabe mencionar que en estos estudios se evaluaba conjuntamente el condicionamiento del miedo a estímulos discretos como el tono, lo cual puede influir en el condicionamiento al contexto, pues la mera ausencia del tono en las sesiones de test contextual, en las que el animal es expuesto al contexto en el que se realizó el condicionamiento pero no al tono, puede ser percibido como un nuevo contexto (Bernier et al., 2017). Por otra parte, la administración de más de 1 shock, puede producir un paradójico aumento del freezing

sin nuevas reexposiciones al US (Poulos et al., 2016), lo que es conocido como incubación o efecto Napalkov (Chorot, 1991).

En el presente estudio, demostramos como una única exposición a un único shock de 0.3mA durante 0.5 segundos ya es capaz de producir miedo condicionado al contexto. Estos hallazgos siguen la línea de hallazgos previos que indican que una sola exposición al US es capaz de producir freezing que se mantiene durante 28 días (Poulos et al., 2016).

En cuanto a condicionamientos con estímulos discretos como el tono, se han encontrado resultados contradictorios en cuanto hembras y machos (Velasco et al., 2019). Cabe hacer mención que todos los estudios revisados emplean únicamente machos en sus experimentos, en contraste, en el presente estudio incluimos también el estudio de las hembras. Aunque en el presente estudio no hemos controlado los niveles hormonales ni los ciclos estrales, en disonancia con otros estudios encontramos que las hembras presentan niveles más elevados de freezing y mejores ratios de extinción que los machos siendo ambos sexos de la misma edad y camada (Velasco et al., 2019). De igual forma, es digno de mencionar que investigaciones previas muestran que la respuesta de las hembras tiene un importante componente activo, y por ende la única evaluación de las respuestas pasivas como el freezing pueden estar infraestimando la respuesta conductual las ratas hembra (Gruene et al., 2015; Taylor et al., 2000).

Se ha planteado que los déficits en la extinción pueden contribuir al desarrollo de trastornos como el TEPT (Sangha et al., 2020). En el marco de la investigación de los trastornos de ansiedad, el término "extinción" se ha utilizado para describir tanto el procedimiento (presentaciones del CS sin el US) como el fenómeno conductual (pérdida de la CR) (LeDoux, 2014). La terapia de exposición, una de las terapias cognitivo-conductuales más comunes para el

tratamiento de trastornos relacionados con la ansiedad y el estrés, utiliza la extinción para reducir el miedo aprendido desadaptativo. Por ello, el desarrollo de un modelo robusto de condicionamiento de miedo es de vital importancia para lograr una mejor comprensión de estos procesos y aumentar la efectividad de las terapias tanto conductuales como farmacológicas actuales para el tratamiento de estos trastornos (Maren et al., 2013). Encontramos un déficit en el estudio del sexo femenino dentro de este campo concreto de la neurociencia, a pesar del crecimiento exponencial del número de trabajos centrados en la extinción del miedo, son pocos los estudios que utilizan modelos animales que incluyen ambos sexos en su diseño (Velasco et al., 2019). Además, teniendo en cuenta que los trastornos de ansiedad son el doble de prevalentes en mujeres que en hombres (Velasco et al., 2019), consideramos crucial la inclusión del sexo femenino en este campo de estudio, de forma que se pueda dilucidar los mecanismos subyacentes que conducen a esta diferencia entre ambos sexos y aumento de la prevalencia del sexo femenino, con la consecuente posibilidad futura de desarrollar terapias especializadas.

A pesar de su inmensa relevancia teórica y traslacional los mecanismos que diferencian la seguridad del peligro o miedo siguen sin estar claros (Sangha et al., 2020). El circuito más estudiado en este respecto es el conocido circuito cerebral anterior, que incluye la amígdala, córtex prefrontal e hipocampo (Fanselow, 2010; Myers & Davis, 2007; Sangha et al., 2020). Sin embargo, la contribución de otras áreas en el aprendizaje y memoria contextual es poco conocido (Keene & Bucci, 2008). Estudios previos indican que las lesiones del RSC previas o posteriores al entrenamiento, atenúan el condicionamiento contextual del miedo (Keene & Bucci, 2008; Todd et al., 2017), además, conjuntamente

con el hipocampo contribuye al efecto de facilitación de la preexposición al contexto (Todd et al., 2017). Esta área está en una posición clave, pues se encuentra entre las regiones corticales sensoriales y el sistema parahipocampal – hipocampal influyendo en la función del lóbulo temporal medial a través de conexiones directas con el hipocampo (Keene & Bucci, 2008; Todd et al., 2017). Por ello el RSC podría tener un rol integral en el aprendizaje y memoria contextual (Bucci & Robinson, 2014; Keene & Bucci, 2008).

5. Conclusión

Esta investigación pretende identificar modelos eficaces para la adquisición, extinción y mantenimiento de las memorias de miedo contextuales. A partir del análisis conductual de dos modelos de CxFC se puede concluir que la organización y espaciamiento en el tiempo de las sesiones son factores relevantes para la instauración y extinción de las memorias de miedo. Los resultados indican que la extinción del miedo al contexto se produce con mayor robustez estadística cuando las sesiones de extinción son repartidas entre varios días. En conjunto, los presentes hallazgos establecen parámetros procedimentales y conductuales que son susceptibles de análisis de sistemas neurales de tres resultados clínicamente relevantes del condicionamiento del miedo: adquisición, mantenimiento y resistencia a la extinción.

Es necesario seguir examinando nuevos protocolos y configuraciones contextuales incluyendo sujetos de ambos sexos para comprender mejor los circuitos neuronales implicados en el procesamiento del contexto en sujetos normales e identificar las anomalías que pueden acompañar a diversos trastornos psiquiátricos (Maren et al., 2013; Sangha et al., 2020)

6. Bibliografía

- Bae, S. E., Holmes, N. M., & Westbrook, R. F. (2015). False context fear memory in rats. *Learning and Memory*, 22(10), 519–525. <https://doi.org/10.1101/lm.039065.115>
- Baldi, E., & Bucherelli, C. (2014). Entorhinal cortex contribution to contextual fear conditioning extinction and reconsolidation in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 110, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.02.004>
- Bernier, B. E., Anthony, X., Lacagnina, F., Ayoub, X. A., Shue, X. F., Zemelman, B. V., Krasne, F. B., & Drew, M. R. (2017). Dentate Gyrus Contributes to Retrieval as well as Encoding: Evidence from Context Fear Conditioning, Recall, and Extinction. *Journal of Neuroscience*, 37(26), 6359–6371. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3029-16.2017>
- Bucci, D. J., & Robinson, S. (2014). Toward a Conceptualization of Retrohippocampal Contributions to Learning and Memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 0, 197. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2014.05.007>
- Chaaya, N., Jacques, A., Belmer, A., Beecher, K., Ali, S. A., Chehrehasa, F., Battle, A. R., Johnson, L. R., & Bartlett, S. E. (2019). Contextual fear conditioning alter microglia number and morphology in the rat dorsal hippocampus. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00214>
- Chorot, P. (1991). Teoría de la incubación de la ansiedad: evidencia empírica. *Revista de Psicología General y Aplicada: Revista de La Federación Española de Asociaciones de Psicología*, 44(4), 435–445. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2860541.pdf>
- Fanselow, M. S. (2010). From contextual fear to a dynamic view of memory systems. *Trends in Cognitive Sciences*, 14(1), 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2009.10.008>
- Fournier, D. I., Eddy, M. C., DeAngeli, N. E., Huszár, R., & Bucci, D. J. (2019). Retrosplenial cortex damage produces retrograde and anterograde context amnesia using strong fear conditioning procedures. *Behavioural Brain Research*, 369, 111920. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111920>
- Gruene, T. M., Roberts, E., Thomas, V., Ronzio, A., & Shansky, R. M. (2015). Sex-specific neuroanatomical correlates of fear expression in prefrontal-amygdala circuits. *Biological Psychiatry*, 78(3), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.11.014>
- Keene, C. S., & Bucci, D. J. (2008). Neurotoxic Lesions of Retrosplenial Cortex Disrupt Signaled and Unsignaled Contextual Fear Conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 122(5), 1070–1077. <https://doi.org/10.1037/a0012895>
- LeDoux, J. E. (2014). Coming to terms with fear. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 111, Issue 8, pp. 2871–2878). <https://doi.org/10.1073/pnas.1400335111>
- Majchrzak, M., Ferry, B., Marchand, A. R., Herbeaux, K., Seillier, A., & Barbelivien, A. (2006). Entorhinal cortex lesions disrupt fear conditioning to background context but spare fear conditioning to a tone in the rat. *Hippocampus*, 16(2), 114–124. <https://doi.org/10.1002/hipo.20138>
- Maren, S., Phan, K. L., & Liberzon, I. (2013). The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neuroscience*, 14(6), 417–428. <https://doi.org/10.1038/nrn3492>
- Myers, K. M., & Davis, M. (2007).

- Mechanisms of fear extinction. In *Molecular Psychiatry* (Vol. 12, Issue 2, pp. 120–150). <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001939>
- Pereira, C. W., Santos, F. N., Sánchez-Pérez, A. M., Otero-García, M., Marchioro, M., Ma, S., Gundlach, A. L., & Olucha-Bordonau, F. E. (2013). Electrolytic lesion of the nucleus incertus retards extinction of auditory conditioned fear. *Behavioural Brain Research*, *247*, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.03.025>
- Poulos, A. M., Mehta, N., Lu, B., Amir, D., Livingston, B., Santarelli, A., Zhuravka, I., & Fanselow, M. S. (2016). Conditioning- and time-dependent increases in context fear and generalization. *Learning and Memory*, *23*(7), 379–385. <https://doi.org/10.1101/lm.041400.115>
- Robinson, S., Adelman, J. S., Mogul, A. S., Ihle, P. C. J., & Davino, G. M. (2018). Putting fear in context: Elucidating the role of the retrosplenial cortex in context discrimination in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *148*, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.12.009>
- Sangha, S., Diehl, M. M., Bergstrom, H. C., & Drew, M. R. (2020). Know safety, no fear. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 108, pp. 218–230). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.11.006>
- Sierra-Mercado, D., Padilla-Coreano, N., & Quirk, G. J. (2011). Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*, *36*(2), 529–538. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.184>
- Stansley, B. J., Fisher, N. M., Gogliotti, R. G., Lindsley, C. W., Conn, P. J., & Niswender, C. M. (2018). Contextual Fear Extinction Induces Hippocampal Metaplasticity Mediated by Metabotropic Glutamate Receptor 5. *Cerebral Cortex*, *28*, 4291–4304. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx282>
- Szönyi, A., Sos, K. E., Nyilas, R., Schlingloff, D., Domonkos, A., Takács, V. T., Pósfai, B., Hegedüs, P., Priestley, J. B., Gundlach, A. L., Gulyás, A. I., Varga, V., Losonczy, A., Freund, T. F., & Nyiri, G. (2019). Brainstem nucleus incertus controls contextual memory formation. *Science (New York, N.Y.)*, *364*(6442). <https://doi.org/10.1126/science.aaw0445>
- Taylor, S. E., Klein, L. C., Lewis, B. P., Gruenewald, T. L., Gurung, R. A. R., & Updegraff, J. A. (2000). Biobehavioral responses to stress in females: Tend-and-befriend, not fight-or-flight. *Psychological Review*, *107*(3), 411–429. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.107.3.411>
- Todd, T. P., DeAngeli, N. E., Jiang, M. Y., & Bucci, D. J. (2017). Retrograde amnesia of contextual fear conditioning: Evidence for retrosplenial cortex involvement in configural processing. *Behavioral Neuroscience*, *131*(1), 46–54. <https://doi.org/10.1037/bne0000183>
- Velasco, E. R., Florido, A., Milad, M. R., & Andero, R. (2019). Sex differences in fear extinction. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 103, pp. 81–108). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.05.020>