

**“EFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE LAS OSCILACIONES
CEREBRALES DE LA MEMORIA DE MIEDO EN LA CORTEZA
PREFRONTAL DE RATA”**

Tesis entregada a
LA UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
en Cumplimiento Parcial de los requisitos para optar al grado de
Doctor en Ciencias con Mención en Neurociencia

Facultad De Ciencias
Por
Mauricio Leonardo Ramírez González
Abril, 2021
Dirigida por: Alexies Dagnino Subiabre

ÍNDICE

ABREVIACIONES	II
I. INTRODUCCIÓN	1
1. IMPORTANCIA	1
2. ESTRÉS.....	2
3. MIEDO Y CORTEZA PREFRONTAL DORSOMEDIAL	6
4. EFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO EN EL MIEDO	8
5. OSCILACIONES CEREBRALES Y LA MEMORIA DE MIEDO	10
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
1. HIPÓTESIS.....	14
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo general	14
2.2 Objetivo específico	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
1. BIENESTAR ANIMAL	15
2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	15
3. ESTRÉS CRÓNICO POR RESTRICCIÓN DE MOVIMIENTO	15
4. PRUEBA DE CAMPO ABIERTO.....	16
5. PARADIGMA DEL MIEDO CONDICIONADO.....	17
6. CIRUGÍA Y ARREGLO DE MICROELECTRODOS	18
7. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	20
8. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.....	21
9. ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS	22
10. DENSIDAD DE LA POTENCIA ESPECTRAL	23
11. ESPECTROGRAMA DE PERIEVENTOS	24
13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25

IV. RESULTADOS	27
1. PRUEBA DE CAMPO ABIERTO	27
2. CONDICIONAMIENTO AL MIEDO	28
3. OSCILACIONES CEREBRALES DURANTE LA EVOCACIÓN DEL MIEDO	30
4. EFECTO DEL ECR SOBRE LAS OSCILACIONES CEREBRALES DE 1 A 4 HZ DURANTE LA EVOCACIÓN DEL MIEDO	35
5. EFECTO DE LA VELOCIDAD DE LOS ANIMALES IMPLANTADOS SOBRE LAS OSCILACIONES CEREBRALES RELACIONADAS CON LA MEMORIA DE MIEDO.....	41
V. DISCUSIÓN	44
1. CONDICIONAMIENTO AL MIEDO Y OSCILACIONES CEREBRALES EN LA CPFDM.....	44
2. ASPECTOS TÉCNICOS DEL MODELO DE ESTRÉS USADO	49
3. EVOCACIÓN DE LA MEMORIA DE MIEDO EN LAS RATAS IMPLANTADAS CON AMES	51
4. EFECTO DEL ESTRÉS SOBRE LAS OSCILACIONES CEREBRALES DE LA MEMORIA DE MIEDO.....	53
5. EFECTO DE LA VELOCIDAD DE DESPLAZAMIENTO DE LOS ANIMALES IMPLANTADOS SOBRE LAS OSCILACIONES DE LA MEMORIA DE MIEDO	56
6. MODELO PROPUESTO DEL EFECTO DEL ECR SOBRE LAS DINÁMICAS DEL CIRCUITO DEL MIEDO	57
VI. CONCLUSIÓN.....	61
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	62

ABREVIACIONES

ABL= Amígdala basolateral

AME= Arreglo de microelectrodo

AC= Amígdala central

AL= Amígdala lateral

APA= Asociación psiquiátrica americana

BNST= Núcleo del lecho de la estría terminal

C= Celsius

CIL= Corteza infralímbica

cm= centímetro

CORT= Corticosterona

CPFm= Corteza prefrontal medial

CPFdm= Corteza prefrontal dorsomedial

CPFvm= Corteza prefrontal ventromedial

CPL= Corteza prelímbica

CRF= Factor liberador de corticotropina

dB= Decibel

DPE= Densidad de la potencia espectral

DPN= Día post natal

EC= Estímulo condicionado

EC+= Estímulo condicionado asociado al footshock

EC-= Estímulo condicionado no asociado al footshock

ECR= Estrés crónico por restricción de movimiento

ENC= Estímulo no condicionado

g= Gramo

GABA= Ácido γ -aminobutírico

GABA-A= Receptor del ácido γ -aminobutírico tipo A

GHz= Gigahertz

G Ω = Gigaohm

HPA= Eje hipotálamo-pituitario-adrenal

HPCd= Hipocampo dorsal

HPCv= Hipocampo ventral

Hz= Hertz
Kg= Kilogramos
kHz= Kilohertz
k Ω = Kiloohm
l= Litro
mA= Miliamperes
mg= miligramos
min= Minuto
ml= Mililitro
mm= Milímetros
ms= Milisegundos
mV= Milivolts
nRE= Núcleo reuniens del tálamo
NTS= Núcleo del tracto solitario
PCL= Potencial de campo local
PFA= Paraformaldehído
PV+= Neurona inhibitoria parvoalbúmina positiva
PVN= Núcleo paraventricular del hipotálamo
REM= Movimiento rápido de ojos
RGs= Receptor de glucocorticoides
RMS= Raíz cuadrada del valor medio de los cuadrados
RMs= Receptor de mineralocorticoides
s= segundos
SGP= Sustancia gris periacueductal
TEPT= Trastorno por estrés post traumático
TTL= Transistor-transistor-logic
W= Watt
 μ A= Microamperes
 μ m= Micrómetro

RESUMEN

El miedo es una emoción con un gran valor adaptativo para la supervivencia. Sin embargo, cuando se afecta el procesamiento del miedo en el cerebro se favorece el desarrollo de los trastornos de ansiedad como el estrés postraumático. El estrés es un factor ambiental que afecta áreas del cerebro que regulan el procesamiento del miedo, por ejemplo, el estrés crónico induce atrofia dendrítica y disminuye la excitabilidad en la corteza prefrontal dorsomedial (CPFdm), lo cual se correlaciona con un aumento de la persistencia de la memoria de miedo. En este sentido, la evocación de la memoria de miedo en ratones está asociada a una actividad oscilatoria del potencial de campo local (PCL) en una banda de frecuencia entre 2 y 6 Hz evocada desde la CPFdm.

Existe una pregunta fundamental en el estudio de la neurobiología del estrés, ¿el estrés afecta la actividad neuronal en la CPFdm durante la evocación de la memoria del miedo?. El objetivo principal de esta tesis doctoral fue responder en parte esta pregunta de investigación. Ratas *Sprague-Dawley* fueron implantadas en la CPFdm con arreglos de microelectrodos y luego estos animales fueron entrenados en el paradigma clásico de condicionamiento al miedo Pavloviano. Un grupo de ratas implantadas fueron expuestas al protocolo de estrés crónico de restricción de movimiento, mientras que otro grupo de animales fueron usados como controles. Después del protocolo de estrés se midió la potencia de los PCL que fueron adquiridos en la CPFdm cuando las ratas evocaban la memoria de miedo. La densidad de la potencia espectral aumentó en una frecuencia de banda entre 1 a 4 Hz cuando el comportamiento de freezing se evocó en las ratas no estresadas comparado con eventos de no freezing en estos animales. Contrariamente, las ratas estresadas generalizaron la memoria de miedo y no mostraron diferencias en la potencia de la actividad oscilatoria en la banda de frecuencia de 1 - 4 Hz cuando presentaron o no el comportamiento de freezing en el contexto en que fueron condicionadas al miedo.

Estos resultados sugieren que bajos niveles de la potencia espectral en la banda de frecuencia de 1 - 4 Hz podría estar relacionado con una pérdida de la regulación de la CPFdm

en el procesamiento del miedo condicionado, lo que resulta en la generalización de la memoria de miedo en las ratas estresadas.

ABSTRACT

Fear is an emotion with great adaptive value for survival. However, when fear processing is affected in the brain, anxiety disorders such as post-traumatic stress disorder are induced. Stress is an environmental factor that affects brain areas involved in fear processing, for example, chronic stress triggers dendritic atrophy and decreases excitability in the dorsomedial prefrontal cortex (dmPFC), as well as leads to persistence of fear memory. In line with this, evocation of fear memory in mice is associated to oscillatory activity of the local field potential (LFP) in a frequency band between 2 to 6 Hz, evoked from the dmPFC.

There is a key question in the study of the neurobiology of stress, does stress affect neural activity in the dmPFC *in vivo* during the evocation of fear memory? The aim of this doctoral thesis was to answer in part this research question. *Sprague-Dawley* rats were implanted with microelectrode arrays into the dmPFC and then animals were trained in the classical Pavlovian fear conditioning paradigm. A group of implanted rats were exposed to repeated restraint stress, while another group of animals was used as control. After the stress protocol, LFP activity was recorded in the dmPFC when fear memory was evoked. Power spectrum density increased in a 1 to 4 Hz frequency band when freezing behavior was evoked in non-stressed rats compared to the same animals when they were not freezing. Conversely, fear memory was generalized in the stressed rats and they did not show difference in the power of 1 - 4 Hz oscillatory band irrespective of whether they froze or not, when exposed to the conditioned context.

These results suggest that lower levels of the 1 - 4 Hz frequency band spectral power could be related to a loss of regulation of the dmPFC in the processing of conditioned fear, which in turn leads to generalization of fear memory in stressed rat.

I. INTRODUCCIÓN

1. Importancia

Los sucesos relacionados a las protestas sociales en países como Chile, Ecuador, Estados Unidos, etc., sumado a la reciente crisis sanitaria generada por la pandemia del coronavirus, tienen consecuencias importantes en las sociedades, tanto a nivel político, económico, emocional y de salud, afectando de manera negativa la calidad de vida de las personas (Ozamiz-Etxebarria y col., 2020; Pérez-Cano y col., 2020). Todo esto sumado al elevado nivel de estrés diario que ha sido reportado en países como Chile (Salgado-Roa y Leria-Dulčić, 2019), donde la prevalencia de enfermedades neuropsiquiátricas, como los trastornos ansiosos y la depresión mayor, es de las más altas en el mundo (Vicente y col., 2016), resalta la necesidad de comprender los efectos del estrés en el desarrollo de este tipo de trastornos. El miedo es la respuesta emocional adaptativa a una amenaza real o percibida como inminente, mientras que la ansiedad es la anticipación a una amenaza futura (Davis y col., 2010; APA, 2013). Cuando estas emociones se expresan de manera excesiva en una persona, de modo que no pueden ser controladas, se producen perturbaciones en el comportamiento, lo que está relacionado con la aparición de los trastornos de tipo ansioso (APA, 2013). Estos difieren del desarrollo normal del miedo y de la ansiedad por ser persistentes más allá de los periodos normales de manifestación de estas emociones, diferenciándose unos de otros en el tipo de objetos o situaciones que inducen miedo, ansiedad y comportamientos de evitación, los cuales son acompañados con el procesamiento cognitivo asociado (APA, 2013). Así, mientras los trastornos de ansiedad suelen ser altamente comórbidos unos con otros (Kessler y col., 2005; Pérez Benítez y col., 2009), ellos pueden diferenciarse por la examinación cercana de los tipos de situaciones que son temidas o evitadas y el contenido de los pensamientos o creencias asociadas. Por ejemplo, el trastorno de estrés post traumático (TEPT) es un trastorno ansioso producido por el impacto emocional o trauma de un determinado suceso, siendo capaz de provocar una serie de manifestaciones físicas y psicológicas (Carvajal, 2002). Este acontecimiento traumático ha sido definido por la

Asociación Psiquiátrica Americana (APA) como aquella situación psicológicamente estresante que sobrepasa el repertorio de las experiencias habituales de la vida (Carvajal, 2002; APA, 2013). En este sentido, el entendimiento del miedo y el estrés en los trastornos de ansiedad es fundamental para un tratamiento eficaz de estos.

2. Estrés

El concepto de estrés fue definido por Hans Selye a raíz de experimentos hechos en animales con diferentes agentes nocivos o estresores agudos, a este conjunto de respuestas inespecíficas en el tiempo las nombró "*síndrome de adaptación general*" (Selye, 1936; Selye 1946) y luego estrés (Selye, 1950; Jackson, 2014), definiendo a este como una respuesta fisiológica no específica de un organismo ante cualquier necesidad o amenaza que este encuentre (Selye, 1950; Jackson, 2014; Rom y Reznick, 2015). Una buena analogía es dada por el mismo Selye: "El estrés es la interacción entre daño y defensa, como en la física la tensión o presión representa la interacción entre una fuerza y la resistencia ofrecida a esta" (Selye, 1950). Así, ante la presencia de una demanda medioambiental o estresor, se activan distintos circuitos en el cuerpo que interactúan con el fin de lograr la adaptación. Una de las respuestas primarias a los estresores involucra al sistema nervioso autónomo a través del eje simpático-adrenérgico-noradrenérgico (Tafet y Bernardini, 2003). Las señales provenientes del exterior (medio ambiente) e interior (interocepción) del organismo son enviadas a través del sistema nervioso periférico desde de los órganos sensoriales a estructuras como el tálamo medial. De allí la información puede viajar directamente a la amígdala lateral (AL) o a estructuras corticales de mayor procesamiento de la información sensorial, como la corteza olfativa, piriforme e insular (Tafet y Bernardini, 2003) y luego a la AL, desde donde la información se envía a la amígdala central (AC) (LeDoux, 2000). Posteriormente, la AC activa varias estructuras como la sustancia gris periacueductal (SGP), el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) y el hipotálamo lateral, produciendo señales que están asociadas a comportamientos defensivos, regulación del eje del hipotálamo, la glándula pituitaria y la corteza de la glándula adrenal (eje HPA) y la activación de la respuesta de lucha y escape, respectivamente (LeDoux y col., 1988). Además, durante eventos de estrés agudo o repetido,

la AC provoca la liberación de catecolaminas como la dopamina, adrenalina y noradrenalina en áreas del tronco encefálico como la sustancia nigra, el núcleo del tracto solitario (NTS), y el núcleo del locus coeruleus, respectivamente (Wallace y col., 1989). Este último núcleo también puede ser activado por aferencias excitatorias del núcleo paragigantocelular ante la presencia de un estresor (Valentino y col., 1993). De esta manera, a través de hipotálamo lateral se activan neuronas preganglionares del sistema nervioso simpático de la columna celular intermedio lateral de la espina dorsal y del retículo ventrolateral rostral, con la posterior activación a través del nervio esplánico de la médula de las glándulas adrenales, produciendo la liberación desde las células cromafines de adrenalina principalmente y noradrenalina en cuestión de segundos (de Diego y col., 2008; Ulrich-Lai y Herman, 2009; Guérineau y Desarménien, 2010). Estas catecolaminas provocan la contracción de los músculos estriados, aumentos de la frecuencia cardíaca, vasoconstricción periférica, la movilización de energía, etc., permitiendo respuestas rápidas de lucha y escape ante amenazas o estresores inminentes (Tafet y Bernardini, 2003; de Diego y col., 2008; Ulrich-Lai y Herman, 2009; Guérineau y Desarménien, 2010).

Otro eje que se activa es el HPA. El último efector de esta cascada es la corteza de las glándulas adrenales, las cuales producen un aumento de los glucocorticoides en la sangre, provocando un incremento en la movilización de la energía a través de la glicogenólisis en el hígado y en el metabolismo neuronal (Myers y col., 2017). Específicamente, desde el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) se secreta factor liberador de corticotropina (CRF), el cual entra al sistema portal hipofisiario por la eminencia media y viaja hasta la adenohipófisis, uniéndose a los receptores de CRF de tipo I, produciendo la secreción de la hormona adrenocorticotrópica, la cual viaja a través de la sangre hasta la corteza adrenal favoreciendo la liberación a la sangre de cortisol en humanos y corticosterona (CORT) en roedores. Estas hormonas se unen a los receptores de mineralocorticoides (RMs) y glucocorticoides (RGs) en el cerebro donde dirigen respuestas, tanto genómicas como no genómicas, con el fin de adaptar al organismo a la nueva situación y restablecer el equilibrio perdido u homeostasis (McEwen y Seeman, 1999; McEwen y col., 2015; Herman y Tasker, 2016; Herman y col., 2016). Existen muchas áreas que pueden activar al PVN y gatillar la liberación del CRF como

respuesta reactiva al estrés. Por ejemplo, las aferencias monosinápticas noradrenérgicas, glutamatérgicas y peptidérgicas del NTS, las aferencias serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe, las aferencias glutamatérgicas del hipotálamo dorsomedial, hipotálamo lateral, hipotálamo posterior, del núcleo parabraquial y de la SGP son importantes en la activación y/o regulación del PVN (Ulrich-Lai y Herman, 2009; Myers y col., 2017). El PVN también es activado por la disminución del número de los canales de cloruro KCC2, que produce un cambio en la gradiente electroquímica del ácido γ -aminobutírico (GABA), llevando a la despolarización de las células del PVN. Las citoquinas como la interleuquina I y el factor de necrosis tumoral alfa a través del NTS también pueden influenciar la activación del PVN (Tafet y Bernardini, 2003; Herman y col., 2016).

La generación de las respuestas al estrés, tanto anticipatorias como reactivas, también involucra la interacción de señales multimodales complejas a través de un procesamiento de la información sensorial de mayor orden, que responden tanto a estresores medioambientales e interoceptivos, como a estresores psicológicos, los cuales pueden ser integrados a nivel de estructuras del tronco encefálico como el NTS, la SGP, el núcleo parabraquial, el núcleo del locus coeruleus, etc, (McEwen y col., 2015). De esta manera, estructuras límbicas como el hipocampo ventral (HPCv), la corteza prefrontal medial (CPFm), a través de sus subdivisiones prélimbica (CPL) e infralímbica (CIL), y la amígdala, a través de sus núcleos como la AC, amígdala medial y la amígdala basolateral (ABL), son claves para la regulación del eje HPA (Tafet y Bernardini, 2003; Ulrich-Lai y Herman, 2009; McKlveen y col., 2015; McEwen y col., 2015; Herman y col., 2016). Estas áreas no proyectan directamente al PVN, sino que lo hacen a través de estructuras intermedias. Por ejemplo, existe activación trans sináptica a través de proyecciones inhibitorias de la AC y la amígdala medial al BNST que produce una disminución del tono inhibitorio de esta estructura, lo que lleva a la activación del PVN, causando así la desinhibición del eje HPA. También, la CIL manda proyecciones hacia el NTS que contiene neuronas glutamatérgicas y noradrenérgicas que activan al PVN (Herman y Tasker, 2016; Herman y col., 2016).

Por otro lado, el término adecuado de la respuesta al estrés es fundamental, ya que si esta se prolonga induce respuestas maladaptativas, derivando tanto en enfermedades sistémicas

como en trastornos psiquiátricos (Herman y Tasker, 2016; Herman y col., 2016). Una adecuada retroalimentación negativa del eje HPA a través de los RGs es fundamental para el reestablecimiento de la homeostasis. La activación de los RGs favorece la síntesis de endocannabinoides, los cuales actúan a nivel presináptico en el PVN a través de los receptores de cannabinoides tipo I inhibiendo la actividad glutamatérgica (McEwen y col., 2015). Por otro lado, proyecciones GABAérgicas al PVN provenientes del hipotálamo lateral, hipotálamo dorsomedial y desde estructuras como el BNST son claves para la terminación de la respuesta al estrés (Ulrich-Lai y Herman, 2009; Herman y col., 2016). Al igual que la excitación trans sináptica, también existe inhibición trans sináptica, la cual es igualmente producida por el HPCv y la CPFm, tanto por la CPL como por la CIL. Estas estructuras establecen conexiones glutamatérgicas con el BNST, proveyendo un mayor input GABAérgico al PVN (McKlveen y col., 2015; Herman y col., 2016).

No todas las situaciones estresantes son negativas, adaptación a retos breves y controlables es llamado eustrés. Sin embargo, si estos retos o situaciones se hacen más intensas, persistentes e incontrolables en el tiempo, pueden derivar en distrés o estrés maladaptativo, estado asociado a los trastornos psiquiátricos (Selye, 1975; Tafet y Bernardini, 2003; Goldstein, 2010; Kupriianov y Zhdanov, 2014). Esta visión de que el estrés no es negativo *per se* ha generado en el campo de la neurobiología el concepto de alostasis, que es el proceso activo de adaptarse para lograr la homeostasis a través del cambio (McEwen y Seeman, 1999; Goldstein, 2010; Kupriianov y Zhdanov, 2014; McEwen y col., 2015; McEwen y Akil, 2020). Este concepto ubica al cerebro como el centro integrativo de las respuestas a los estresores, tanto externos como internos, ya sean estos físicos, psicológicos y/o emocionales (McEwen y Seeman, 1999; McEwen y col., 2015; McEwen y Akil, 2020). Además, la respuesta alostática depende de los eventos que han ocurrido en la vida de una persona, incluso antes de la concepción de esta, pasando por la gestación, infancia, adolescencia y adultez, junto con los cambios epigenéticos que ocurren debido a la experiencia (McEwen y col., 2015; McEwen y Akil, 2020). De esta manera, el hecho de adaptarse a situaciones adversas y llegar a un nuevo umbral de equilibrio genera un gasto energético en el cuerpo, a este proceso se le ha llamado carga alostática (McEwen y Seeman, 1999; Goldstein, 2010; Kupriianov y Zhdanov, 2014;

McEwen y col., 2015; McEwen y Akil, 2020). Así, cuando el individuo es incapaz de adaptarse debido a que no puede generar respuestas alostáticas eficientes, ocurre una sobrecarga alostática, la cual puede derivar tanto en enfermedades sistémicas como en trastornos del comportamiento (McEwen y col., 2015; McEwen y Akil, 2020).

3. Miedo y Corteza prefrontal dorsomedial

El miedo es un estado de aprehensión generalmente adaptativo, que aparece rápidamente ante una amenaza real e inminente (Davis y col., 2010), estimulando estrategias de defensa activas y pasivas del organismo, como por ejemplo el comportamiento de lucha y escape, la respuesta de sobresalto y el freezing o congelamiento (Blanchard y col., 1976), que activan tanto al sistema nervioso autónomo como al eje HPA (Hagenaars y col., 2014). El miedo se disipa una vez que la amenaza desaparece (Blanchard y col., 1976; Blanchard y col., 1993; Davis y col., 2010). Además, el miedo puede ser aprendido a través del condicionamiento Pavloviano, el cual es un paradigma conductual que sirve como modelo para entender las bases biológicas de los trastornos de ansiedad, incluyendo al TEPT, tanto en roedores como en humanos (LeDoux, 2000; Maren y Holmes, 2016; Klucken y col., 2016). En un experimento clásico de condicionamiento al miedo, se le llama estímulo condicionado (EC) a una señal sensorial que genera una respuesta conductual neutra (ej., un tono menor de 80 dB), mientras que el estímulo no condicionado (ENC) es aquel que produce una respuesta de hiperalerta (ej., un shock eléctrico). Después de varios ensayos de entrenamiento en el cual se presenta el EC pareado con un ENC (EC-ENC), se genera una memoria de miedo, esta etapa se conoce como adquisición del miedo (LeDoux, 2000). Posterior a esta etapa, el EC por si solo es capaz de generar una respuesta condicionada a nivel conductual. La respuesta condicionada se mide principalmente a través del freezing, un comportamiento que corresponde a la inmovilidad del cuerpo, con excepción de los movimientos asociados a la respiración (LeDoux, 2000; Giustino y Maren, 2015) y con episodios de bradicardia (Koba y col., 2016). Una vez generada y consolidada la memoria de miedo, en otra etapa conocida como extinción del miedo, la sola presentación repetida del EC a través de varios ensayos produce la extinción del miedo previamente condicionado (Quirk y Mueller, 2008; Maroun,

2013; Giustino y Maren, 2015). Sin embargo, la memoria de miedo previamente adquirida no desaparece después de la extinción, ya que puede retornar con el transcurso del tiempo o a través de un cambio de contexto (Quirk y Mueller, 2008; Urcelay y Miller, 2014). El eje que incluye al hipocampo, la CPFm y la amígdala tiene un rol fundamental en la regulación de las conductas asociadas al miedo (Quirk y Mueller, 2008; Sierra-Mercado y col., 2011; Sotres-Bayon y col., 2012; Cho y col., 2013).

La CPFm regula varios procesos cognitivos como la memoria de trabajo, la atención, la toma de decisiones, el manejo del control autonómico y la regulación de las emociones (Heidbreder y Groenewegen, 2003). Esta estructura tiene su propia heterogeneidad funcional, tanto a nivel medio-lateral (Riga y col., 2014; van Aerde y Feldmeyer, 2015), como a través de su orientación dorso-ventral, donde ha sido dividida en corteza prefrontal dorsomedial (CPFdm) y ventromedial (CPFvm) (Heidbreder y Groenewegen, 2003; Vertes, 2004). Estas dos áreas a su vez contienen a tres subregiones: La CPFdm involucra a la corteza cingulada anterior y a la parte dorsal de la CPL, mientras que la CPFvm contiene a la parte ventral de la CPL y a la CIL, teniendo estas áreas distintos roles en la regulación del miedo (Heidbreder y Groenewegen, 2003; Giustino y Maren, 2015). Específicamente, la CPL regula la expresión del miedo, mientras que la CIL regula la extinción del miedo previamente condicionado (Quirk y Mueller, 2008; Maroun, 2013; Giustino y Maren, 2015). Uno de los primeros estudios realizados en ratas que involucró una lesión en la CPL generó un incremento del freezing, tanto al EC como al contexto durante las etapas de adquisición y extinción, sugiriendo que lesiones en la CPFdm aumentan el miedo condicionado (Morgan y LeDoux, 1995). Sin embargo, estudios farmacológicos más recientes muestran que la inactivación de la CPL, a través de la infusión de tetrodoxina (un bloqueador de los canales de Na⁺ dependientes de voltage) (Corcoran y Quirk, 2007) y muscimol (agonista del receptor GABA-A) (Blum y col., 2006), reducen la evocación de la memoria de miedo. Siguiendo la misma línea argumental, otros estudios muestran que la inactivación de la CPL con muscimol previo a la fase de la extinción, también reduce la evocación del miedo (Sierra-Mercado y col., 2011). Además, esta manipulación farmacológica no tiene efectos a largo plazo sobre la evocación de la extinción del miedo condicionado, lo que sugiere que la inactivación de la CPL interfiere con la

expresión del miedo, pero no con la adquisición y consolidación de la memoria de extinción (Laurent y Westbrook, 2009; Sierra-Mercado y col., 2011). En contraste, la microestimulación eléctrica de la CPL aumenta la evocación del miedo previniendo la consolidación de la memoria de extinción (Vidal-Gonzalez, 2006). Consistente con este aumento de la evocación del miedo, se observó que durante el comportamiento de freezing generado por los tonos en la fase de adquisición del miedo y extinción temprana (primeros ensayos), la actividad excitatoria de las neuronas principales localizadas en la CPL aumenta con respecto a la extinción tardía (últimos ensayos), donde un nuevo aprendizaje se está generando, mientras que una mayor actividad de estas neuronas está asociada con una menor evocación de la extinción del miedo (Burgos-Robles y col., 2009). Además, el aumento de actividad de estas neuronas en la CPL precede al comportamiento de freezing (Burgos-Robles y col., 2009). Estos trabajos indican que la actividad de las neuronas de la CPL es necesaria para la expresión del miedo condicionado y podría modular la extinción de este (Vidal-Gonzalez, 2006; Burgos-Robles y col., 2009). En concordancia con esta hipótesis, estudios en la CPL y CIL de expresión de proteínas como c-fos y Zif 268, que son codificadas a partir de genes tempranos inmediatos, muestran que durante la evocación de una memoria de miedo a través de la presentación de un tono previamente extinguido fuera del contexto de la extinción produce un aumento de c-fos en la CPL, mientras que durante la evocación de la memoria de extinción a través de la presentación del tono extinguido en el mismo contexto de la extinción induce la expresión de c-fos en la CIL (Knapska y Maren, 2009). Similarmente, los niveles de Zif268 fueron mayores en la CPL durante la evocación del miedo contextual (Stern y col., 2014).

4. Efecto del estrés crónico en el miedo

Evidencias en humanos muestran que las personas con trastornos ansiosos, incluyendo al TEPT, presentan alteraciones en la adquisición y evocación de la memoria de extinción del miedo, mostrando un aumento del miedo condicionado durante los ensayos de extinción (Orr y col., 2000; Blechert y col., 2007; Duval y col., 2015; Maren y Holmes, 2016). También, los pacientes con TEPT tienen un aumento de la actividad de la corteza cingulada anterior dorsal,

el análogo funcional de la CPL en roedores, mientras que se observa una disminución de la actividad de la CPFvm, el análogo funcional de la CIL (Pitman y col., 2012; Milad y Quirk, 2012). En concordancia a lo encontrado en humanos, cuando a las ratas se les aplica un protocolo de estrés crónico por restricción de movimiento (ECR) previo al condicionamiento del miedo, estas presentan un aumento de la adquisición del miedo condicionado (Conrad y col., 1999; Wilber y col., 2011; Hoffman y col., 2014) y un deterioro en la consolidación de la memoria de extinción (Miracle y col., 2006; Wilber y col., 2011; Hoffman y col., 2014). Además, la aplicación del ECR provoca la atrofia de las dendritas distales de las neuronas piramidales localizadas en la capa II, III (Cook y Wellman, 2004; Radley y col., 2004; Brown y col., 2005; Radley y col., 2005; Radley y col., 2006) y V (Liu y Aghajanian, 2008) de la CPFdm, con una pérdida de hasta un tercio de la densidad de espinas dendríticas en las capas II y III (Radley y col., 2006). Las capas II y III de la CPFvm también presentan las mismas alteraciones inducidas por el ECR (Shansky y col., 2009). Además, protocolos similares de estrés crónico inducen hipertrofia de las neuronas GABAérgicas inhibitorias llamadas células Martinotti en la CPFdm (Gilabert-Juan y col., 2013), atrofia de las neuronas piramidales del área CA3 en el hipocampo dorsal (HPCd) (Conrad y col., 1999; Vyas y col., 2002) y en el HPCv (Christian y col., 2011), hipertrofia dendrítica en las neuronas piramidales de la ABL (Vyas y col., 2002), acompañada de un aumento de la excitabilidad en la forma de potenciales de acción evocados (Rosenkranz y col., 2010) y atrofia de las neuronas GABAérgicas inhibitorias en la ABL (Gilabert-Juan, y col., 2011).

Interesantemente, en ratas implantadas con microelectrodos, la aplicación de ECR produce una disminución de la actividad de unidades individuales o spikes de las neuronas piramidales en la CPL durante el tono en la etapa de la adquisición del miedo condicionado, mientras que en la CIL la actividad de spikes de estas neuronas disminuye durante el tono en la evocación del miedo extinguido, lo que se correlaciona con un aumento del comportamiento de freezing durante los primeros tonos en esta etapa (Wilber y col., 2011).

Alteraciones en el funcionamiento del eje HPA contribuye a la etiología de los trastornos de ansiedad, incluido el TEPT (de Kloet y col., 2006). Los glucocorticoides juegan un rol importante en la regulación de la respuesta al estrés a través de la acción directa sobre los

RMs y RGs en la CPFm (Diorio y col., 1993). Siguiendo la misma línea argumental, la administración crónica de CORT durante 3 semanas produce un aumento del miedo condicionado (Marks y col., 2015), como también la atrofia de las dendritas en las neuronas piramidales de la capa II y III de la CPL (Wellman, 2001). Además, después de protocolos de estrés crónico los RGs disminuyen en su número y expresión en la CPFm afectando la retroalimentación negativa del eje HPA (Mizoguchi y col., 2003; Chiba y col., 2012; McKlveen y col., 2015).

5. Oscilaciones cerebrales y la memoria de miedo

Los potenciales de campo local (PCL) son potenciales extracelulares que emergen desde las corrientes transmembrana, incluídas las corrientes capacitivas, que pasan a través de las membranas celulares y se superimponen en un punto en el espacio extracelular (Einevoll y col., 2013). La diferencia de potencial entre dos ubicaciones establece un campo eléctrico (Buzsáki y col., 2012). Estos potenciales eléctricos pueden ser medidos en el cerebro a través de electrodos ubicados en una zona de interés como la corteza (Mazzoni y col., 2012; Einevoll y col., 2013). De esta manera, el PCL puede ser definido como una señal neuronal masiva registrada por electrodos intracraneales, la cual es obtenida al filtrar normalmente la señal entre el rango de frecuencia de 100 a 300 Hz hacia abajo (filtro de pasa baja) (Mazzoni y col., 2012). Debido a los múltiples procesos neuronales que contribuyen a la formación del PCL, como la actividad sináptica, los potenciales de acción (spikes), los spikes de calcio, las corrientes intrínsecas activadas por voltaje, las propiedades resonantes de los distintos tipos neuronales, la hiperpolarización de un conjunto de neuronas, la conducción por volumen, etc., la señal es inherentemente ambigua y más difícil de interpretar que los spikes (Buzsáki y col., 2012; Einevoll y col., 2013; Whitmore y Lin, 2016). Sin embargo, uno de los principales componentes de los PCL corticales son los input o entradas sinápticas, que capturan procesos claves de integración sináptica, los cuales no pueden ser analizados a través de la actividad de spikes de unas pocas neuronas (Buzsáki y col., 2012; Einevoll y col., 2013). De esta manera, cuando un grupo de neuronas o ensamble neuronal sincroniza su actividad eléctrica de manera periódica en el tiempo, los ritmos cerebrales u oscilaciones emergen

desde los PCL (Buzsáki, 2002; Buzsáki y Draguhn, 2004; Colgin, 2011; Buzsáki y col., 2012). Estas oscilaciones dependen tanto de los generadores de corrientes, que son las neuronas o membranas excitables responsables de la magnitud de las oscilaciones cerebrales registradas, como de los generadores rítmicos, que son los grupos de neuronas que producen inputs en un patrón definido, de modo que hacen a un grupo neuronal oscilar a una frecuencia determinada, como ocurre con las oscilaciones theta hipocampales (4 – 8 Hz), las cuales aparecen en regiones corticales (generador de corriente) y son dependientes de las aferencias provenientes del septum medial (generador rítmico) (Buzsáki, 2002). Han surgido modelos para explicar la emergencia de distintos tipos de oscilaciones. Por ejemplo, para la aparición de oscilaciones de tipo gamma (30 – 150 Hz) se han propuesto mecanismos que involucran la sincronización a través de la inhibición mutua de un grupo de neuronas inhibitorias (modelo inhibición – inhibición), como la conexión recíproca entre grupos de neuronas excitatorias e inhibitorias (modelo excitación – inhibición) (Buzsáki y Wang, 2012). Diversas oscilaciones cerebrales asociadas al comportamiento han sido descritas, por ejemplo, las oscilaciones de tipo delta (0,5 – 4 Hz) son importantes para la consolidación de las memorias durante el sueño no-REM (REM; movimiento rápido de ojos) (Maingret y col., 2016), las oscilaciones alfa (8 – 12 Hz) han sido reportadas en estados de relajación en alerta (Sadaghiani y Kleinschmidt, 2016), las oscilaciones theta (4 – 8 Hz) están presentes durante la actividad locomotora (Vanderwolf, 1969), durante el sueño REM (Jouvet, 1969) y durante la expresión del freezing (Seidenbecher y col., 2003), las oscilaciones de tipo gamma (30 – 150 Hz) son importantes en la consolidación de memorias cognitivas (Kanta y col., 2019) y emocionales (Courtin y col., 2014a), así como también en la percepción sensorial (Pritchett y col., 2015).

Las oscilaciones cerebrales pueden establecer conectividad funcional entre distintas regiones del cerebro (Varela y col., 2001; Bonnefond y col., 2017). Además, oscilaciones de diferentes frecuencias se pueden acoplar entre sí, por ejemplo, las oscilaciones de tipo gamma aparecen durante fases específicas de las oscilaciones theta en el hipocampo, siendo esta interacción fundamental para varios procesos cognitivos como la memoria de trabajo y la navegación espacial (Lisman y Jensen, 2013), así como también para la formación de las memorias

emocionales (Bocchio y col., 2017). Es importante destacar que la comunicación entre la CPFdm, la ABL y el HPCv es fundamental para la discriminación entre memorias aversivas y de seguridad (Colgin, 2011; Stujenske y col., 2014), así como también para la evocación de la memoria de extinción del miedo (Lesting y col., 2011; Lesting y col., 2013).

La CPF y la ABL muestran una sincronización y un aumento de la potencia de las oscilaciones theta durante la entrega de los tonos previamente asociados con el footshock (EC+) durante la evocación de la memoria de miedo (Likhtik y col., 2014). Por otro lado, las oscilaciones gamma de alta frecuencia (70 -120 Hz) evocadas en la ABL se acoplan a las oscilaciones theta locales durante la evocación del miedo condicionado (EC+), aunque estas oscilaciones gamma tienen una menor potencia que durante la entrega de una señal no aversiva (EC-), donde muestran un mayor acoplamiento a las oscilaciones theta de la CPFm (Stujenske y col., 2014). Interesantemente, la inhibición de la actividad de las neuronas inhibitorias parvalbúminas positivas (PV+) en la CPFdm produce freezing, esto a través de la desinhibición de las neuronas piramidales, incluso antes de que el condicionamiento al miedo se lleve a cabo, mientras que su activación reduce este comportamiento, silenciando a las neuronas piramidales. Además, esta inhibición de las neuronas PV+ y el correspondiente freezing llevó a un reseteo de la fase de las oscilaciones theta durante el EC+, que fue acompañado por un acoplamiento de fase a estas oscilaciones por parte de las neuronas piramidales de la CPFdm (Courtin y col., 2014b). Otro componente oscilatorio en la CPFdm, que va entre los 2 a 6 Hz, con un peak en los 4 Hz (de aquí en adelante referido como oscilaciones de 4 Hz), ha sido reportado durante el freezing en ratones (Karalis y col., 2016; Dejean y col., 2016; Moberly y col., 2018). Específicamente, esta actividad oscilatoria de 4 Hz predice el inicio del comportamiento de freezing y sincroniza a la ABL (Karalis y col., 2016). También, se ha reportado que estas oscilaciones de 4 Hz reclutan engramas de neuronas piramidales en su fase ascendente (Dejean y col., 2016). Sorprendentemente, cuando se optoestimula a la CPFdm -y no a la ABL- para hacerla oscilar a la frecuencia de 4 Hz, se produce el comportamiento de freezing (Karalis y col., 2016). Además, cuando los ratones se exponen al contexto en el que fueron optoestimulados, estos vuelven a expresar el comportamiento de freezing (Karalis y col., 2016). Estos experimentos demuestran que es

posible generar artificialmente una memoria de miedo en el cerebro (Karalis y col., 2016; Dejean y col., 2016). Otro estudio anterior también demostró la presencia de oscilaciones de 4 Hz durante la memoria de trabajo en la CPFm y en el área tegmental ventral (Fujisawa y Buzsáki, 2011).

Hay muy pocos estudios que exploran el efecto del estrés crónico sobre las oscilaciones cerebrales. En un trabajo de Jacinto y col., 2013, se observó en ratas una disminución de la potencia de las oscilaciones theta en la ABL y el HPCv durante la familiarización en la prueba de campo abierto, la cual fue prevenida por la aplicación de un protocolo de estrés crónico impredecible. Además, los animales que presentaron una mayor reducción de la potencia de las oscilaciones theta entre el primer y el último día de la familiarización viajaron una mayor distancia y gastaron más tiempo en el centro de la prueba de campo abierto, demostrando una menor ansiedad (Jacinto y col., 2013). Cuando se analizó las variaciones de coherencia entre el primer y el último día de familiarización se observó una disminución de la coherencia entre la ABL y el HPCv, sin embargo, en las ratas estresadas esta variación no fue observada (Jacinto y col., 2013). En otro trabajo del mismo grupo, también se analizó el efecto del estrés crónico impredecible sobre las variaciones en la potencia de las oscilaciones theta en el comportamiento ansioso de ratas durante la evaluación del riesgo en el laberinto elevado en cruz (Jacinto y col., 2016). Durante la evaluación del riesgo previo a la futura entrada a los brazos abiertos hubo una disminución de la potencia de las oscilaciones theta en la ABL y el HPCv, mientras que en la CPL se produjo un aumento de la potencia de estas oscilaciones. Interesantemente, en las ratas estresadas el aumento de la potencia de las oscilaciones theta observado en la CPL desapareció.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que las oscilaciones de 4 Hz evocadas en la CPFdm regulan la expresión y evocación de la memoria de miedo y que esta región del cerebro es muy vulnerable a los efectos del estrés crónico, entonces es interesante proponer la siguiente pregunta de investigación: ¿El estrés crónico afecta la dinámica de las oscilaciones cerebrales en la CPFdm en el momento exacto en que se evoca una memoria de miedo?. En esta tesis doctoral se propone responder esta pregunta a través de la siguiente hipótesis y objetivos:

1. Hipótesis

El estrés crónico disminuye la potencia de las oscilaciones de baja frecuencia en la CPFdm durante la evocación de la memoria de miedo, esto se correlaciona con la generalización del miedo condicionado.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general:

Estudiar el efecto del estrés sobre las oscilaciones cerebrales y las memorias de miedo.

2.2 Objetivo específico:

Determinar el efecto del estrés crónico sobre las dinámicas de las oscilaciones cerebrales de baja frecuencia en la CPFdm durante la evocación del miedo condicionado en el comportamiento.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Bienestar animal

Todos los experimentos y manipulaciones relacionadas a la experimentación animal se realizaron de acuerdo al protocolo ético establecido por el “National Institute of Health” (USA) y fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Valparaíso (Protocolos de manejo animal de los proyectos FONDECYT Regular N° 1141276 y Anillo de Ciencia y Tecnología N° ACT1403, Investigador Principal: Alexies Dagnino). Se realizaron los máximos esfuerzos para disminuir el número de animales que se usaron en cada grupo experimental y su sufrimiento para cumplir con el principio de las 3R (Russell y Burch, 1959).

2. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas machos *Sprague-Dawley* adultas en el día post natal (DPN) 55 y con un peso entre los 320 y 380 g al inicio de los experimentos. Los animales estuvieron en la sala de mantención del “Laboratorio de Neurobiología del Estrés”, ubicado en el Instituto de Fisiología de la Universidad de Valparaíso. Las ratas se alojaron en jaulas de acrílico transparente en grupos de a 2 o 3, mientras que la sala estuvo con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (luces encendidas a las 08:00 am), con temperatura y humedad controlada ($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 55%). El alimento (ACWS, N.º catálogo: RMH 3000 LabDiet®, Santiago, Chile) y agua de beber filtrada (Filtro Whirlpool Modelo WK9001QLB, Iowa, USA) fueron dados *ad libitum*. Los experimentos se llevaron a cabo entre las 09:00 y 14:00 horas.

3. Estrés crónico por restricción de movimiento

Las ratas fueron divididas al azar en dos grupos; control y estrés. Ambos grupos se mantuvieron en dos salas distintas y nunca se encontraron después del inicio del protocolo de ECR. Las ratas del grupo control fueron trasladadas a una caja sobre una balanza digital para medirles el peso. A continuación, se les aplicó handling por 5 minutos durante 7 días. Finalizado este procedimiento se retornaron a su caja de alojamiento. Las ratas del grupo

estrés también fueron trasladadas a una caja sobre una balanza digital para evaluarles el peso diario, el cual es un marcador fisiológico del estrés. Posteriormente se les aplicó un protocolo de ECR durante 7 días. El ECR se realizó utilizando una adaptación del procedimiento utilizado en Negrón-Oyarzo y col., 2014. De esta manera, a las ratas del grupo estrés, que fueron implantadas con un arreglo de microelectrodos (AMEs), se las colocó boca abajo en una base de plástico (20 x 13 x 5 cm). Posteriormente, un tubo de policloruro de vinilo de 7,5 cm de diámetro y 13 cm de largo cortado por la mitad a través de su eje longitudinal, y al cual se le adhirió una esponja (Vroka S.A, Santiago, Chile) por el interior para evitar el daño de los animales, fue puesto en la zona dorsal de las ratas. Luego, a través de cintas de velcro, las cuales pasaron por encima del tubo de policloruro de vinilo, se inmovilizó el tronco del animal. Finalmente, a través de cinta adhesiva se fijaron las extremidades a la base de plástico. Con este procedimiento se evitó dañar el implante de los AMEs, ya que las ratas pudieron mover el cuello y la cabeza libremente. De esta manera, las ratas fueron sometidas a restricción de movimiento por 1 hora durante 7 días entre las 10:00 am y las 13:00 pm.

4. Prueba de campo abierto

Para medir la actividad locomotora y la respuesta ansiosa presentada por los animales se utilizó la prueba conductual de campo abierto. Esta consistió de una caja de acrílico negro (70 x 70 x 40 cm) con una iluminación de 300 ± 20 lux (medidos con un luxómetro digital, modelo # LX-1010B, Weafo Instrument Co., Shanghai, China). La prueba de campo abierto duró 5 minutos, durante los cuales se cuantificó la distancia total recorrida medida en cm, la velocidad máxima alcanzada en cm/s y el tiempo transcurrido en el centro medido en s. Para la medición del tiempo transcurrido en el centro del campo abierto, se dividió la arena en 16 cuadrados equidistantes, donde los 4 cuadrados centrales correspondieron al centro. De esta manera, el tiempo en centro fue considerado cuando el centro corporal de la rata, excluyendo la cola, estuvo en el área central del campo abierto. Los videos adquiridos fueron analizados a través del programa Ethovision XT (Noldus, Wageningen, Netherlands).

5. Paradigma del miedo condicionado

Las ratas fueron entrenadas en cajas de condicionamiento (50 x 25 x 25 cm; Model LE 916, Panlab Instruments, Barcelona, España) que tienen como piso una grilla de 38 barras de acero inoxidable dispuestas paralelamente a los divisores. Estas cajas fueron colocadas dentro de una cámara de condicionamiento, la cual estuvo a su vez dentro de un cubículo atenuador de sonido (110 x 50 x 84 cm), cubierto por dentro con una esponja de 7,5 cm de ancho (Vroka S.A, Santiago, Chile). El interior de las cajas de condicionamiento fue iluminado con una luz led (0,5 W) a 250 lux medida por un luxómetro digital (Modelo # LX-1010B, Weafo Instrument Co., Shanghai, China), mientras que el nivel basal de ruido fue de 30 dB (Sonómetro, modelo #1100, Quest Technologies, Oconomowoc, WI). Un tono de 3 kHz amplificado a una potencia de 80 dB durante 30 s fue presentado a los animales como la señal del EC, mientras que la señal del ENC fue presentada como una descarga eléctrica en las patas de los animales (footshock) de 0,5 mA por 0,5 s, la cual co-terminó con la emisión del EC. El EC y el ENC fueron entregados por altavoces ubicados a 20 cm de altura en la pared opuesta de la cámara de grabación y por un shocker (LE 100-26, Panlab S.L., Barcelona, España), respectivamente. La entrega del EC y del ENC fue regulado por el software operante Shutavoid (Panlab S.L., Barcelona, España). El intervalo entre cada uno de los ECs o asociaciones del EC con el ENC varió entre los 60 y 180 s. El comportamiento de los animales durante cada una de las etapas y/o fases del condicionamiento al miedo fue grabado por una cámara "W2100-Video System" (W2100, Multi Channel Systems MCS GmbH, Harvard Bioscience, Inc., Reutlingen, Alemania) montada al frente de las cajas de condicionamiento. La evocación de la memoria de miedo fue identificada a través del comportamiento de freezing, que consistió en la ausencia de movimiento del animal con excepción de los asociados a la respiración (Negrón-Oyarzo y col., 2014). El freezing fue analizado manualmente a través de la inspección de manera ciega por parte del experimentador y en el programa Ethovision XT (Módulo= activity análisis, Noldus, Wageningen, Netherlands). Este fue contabilizado cuando no hubo detección de movimiento por parte de las ratas de al menos 2 s. El paradigma del condicionamiento al miedo fue adaptado del trabajo de Karalis y col., 2016, a un protocolo hecho en nuestro laboratorio

(Negrón-Oyarzo y col., 2014). Las cajas de condicionamiento fueron limpiadas con etanol al 5% entre cada sesión de entrenamiento para evitar el traspaso emocional a través de pistas olfativas. Para la evaluación de la memoria de miedo en el contexto B, el piso fue reemplazado por una superficie de plástico de color negro (25 x 25 cm) y por paredes hechas de cartón (25 x 48 cm) recubiertas por cartulina de color negro con señales visuales como estrellas, triángulos, círculos y cuadrados.

6. Cirugía y Arreglo de microelectrodos

En el DPN 55 a las ratas se les implantó un AME a través de una cirugía estereotáxica. Esta se realizó después de un día de preoperatorio que consistió en dar oralmente por el costado de la boca a cada animal una dosis de 10 mg/Kg de doxiciclina (concentración de 11,08 mg/ml). Una hora antes de la cirugía se les administró intramuscularmente una dosis de 2,5 mg/Kg de acepromacina (concentración al 1%) y 0,1 ml de atropina (concentración al 1%). Luego, las ratas fueron trasladadas a una caja de plástico (32 x 42 x 30 cm) (Caja organizadora, Wenbox, Wenco, Santiago, Chile) sin comida para evitar que se ahoguen y se llevaron a la sala de cirugía en una manta térmica para que mantuvieran la temperatura corporal. La sala de cirugía se mantuvo a una temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Una vez en la sala de cirugía, los animales fueron anestesiados con 3-5% de isoflurano (Lab. Baxter, USA) usando un flujo de oxígeno de 3-4 l/min a través de una cámara de anestesia inhalatoria (Ugo Basile, Cat. No. 21200, VA, Italia). Una vez anestesiados, los animales fueron rasurados en la zona a implantar. Luego, cada animal se puso en el equipo estereotáxico (Modelo SR-6R, Narishige, USA), donde fueron anestesiados con isoflurano al 2,5% en un flujo de oxígeno de 2-3 l/min y se les inyectó subcutáneamente una dosis de 10 mg/Kg de enrofloxacin (concentración al 5%) y 5 mg/Kg de ketoprofeno (concentración al 1%), mientras que intraperitonealmente se les inyectó una dosis de 10 mg/Kg de tramadol (concentración al 5%). Durante toda esta etapa la temperatura del animal fue mantenida en $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ usando una almohada térmica (Harvard Apparatus, MA, USA). La temperatura fue monitoreada con una sonda ubicada a nivel rectal, la cual fue conectada a un controlador de temperatura (Harvard Apparatus, MA, USA). Después de las inyecciones, las ratas fueron implantadas

bilateralmente con un AME (# 17NT100002, Nevrotech, Budapest, Hungría) en la parte dorsal de la CPL, perteneciente a la CPFdm.

Cada AME consistió de 8 electrodos de iridio/platino con un largo de 2,8 mm, un diámetro de 50 μm y una impedancia de 200 k Ω . Además, los electrodos estuvieron cubiertos con un aislante de poliimida que dejó expuesto los últimos 0,5 mm de estos para registrar los PCL en el tejido cerebral. Los ocho electrodos estuvieron dispuestos en 2 grupos de 4 electrodos separados por 1,4 mm (un grupo por hemisferio). Además, estos fueron diseñados en 2 filas de 0,25 mm de espacio entre cada uno de los electrodos y 0,25 mm de espacio entre cada una de las filas. También, cada AME tuvo un electrodo de referencia hecho del mismo material que los electrodos de registro, pero con una impedancia de 10 k Ω , además de un cable de tierra de acero inoxidable de 5 cm que fue atado a tornillos de plata anclados en el cráneo de los animales. Los electrodos estuvieron unidos a un conector omnético de 16 pines (# 17NT100002, Nevrotech, Budapest, Hungría) a través de un epoxi de 3 mm de largo.

Durante la cirugía se separó la piel del cráneo con un bisturí y pinzas hemostáticas para dejar expuesta el área del implante. Posteriormente, con un taladro dental (Modelo SR, Connecticut, USA) se perforó el cráneo de manera bilateral. Luego, con un micromanipulador (SR-6R, Narishige, USA) el AME se bajó lentamente, 1 mm por minuto, hasta alcanzar la CPFdm. Las coordenadas estereotáxicas utilizadas fueron: 2,9 mm antero-posterior, 0,7 mm medio-lateral y 2,8 mm dorso-ventral (Paxinos y Watson, 2007). Finalmente, con la ayuda de 4 tornillos anclados en el cráneo de los animales, donde el cable de tierra fue enrollado, el AME fue fijado con cemento acrílico dental (GC América Inc., Alsip, IL, USA). Luego de finalizar la cirugía los animales fueron trasladados al bioterio usando una manta eléctrica.

El periodo post operatorio tuvo una duración de 7 días en total, donde los primeros 3 días fueron de tratamiento. El tratamiento post operatorio consistió en administrar a las ratas durante el primer día de manera oral una dosis de 10 mg/Kg de doxiciclina (concentración de 11,08 mg/ml) y de 2,5 mg/Kg de ketoprofeno (concentración al 0,4%) y de manera subcutánea tramadol en una dosis de 10 mg/Kg (concentración al 5%). El día 2 y 3 de tratamiento se repitió el mismo procedimiento del primer día, pero solo con la administración de doxiciclina y ketoprofeno. Luego, los animales se dejaron 4 días más en recuperación antes de realizar los

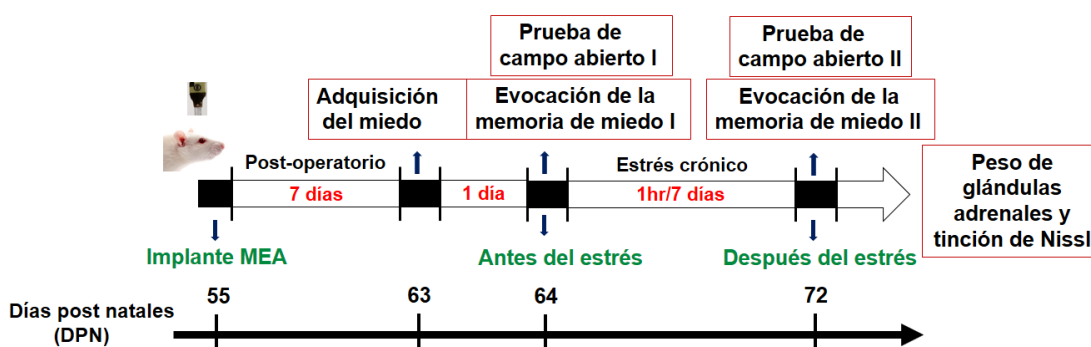
registros en las pruebas conductuales. Desde la finalización de la cirugía las ratas fueron puestas individualmente en una caja de plástico (32 x 42 x 30 cm). De esta manera se evitó que el implante del AME fuese dañado debido a la interacción con un conoespecífico. Para evitar los efectos del estrés por aislamiento social, a las ratas del grupo control y estrés se les asignaron ratas no operadas de su propia camada para que tuvieran interacción social durante 10 minutos diarios bajo la vigilancia del experimentador. Además, estas ratas no operadas se alojaron contiguamente con las ratas del grupo control y estrés. También, se evaluó la recuperación de la anestesia una vez finalizada la cirugía, mientras que el dolor se evaluó a través del uso de la escala de Grimace (Sotocinal y col., 2011), tanto 2 horas después de la cirugía como los primeros 2 días de post operatorio.

7. Diseño experimental

Durante los 7 días de recuperación del periodo post operatorio, entre el DPN 56 y 62, se midió la ganancia de peso (Anexo, Fig. 1). En el DPN 63 se realizó la fase de habituación, que consistió en la entrega de 4 ECs. Dos horas después, en la fase del condicionamiento al miedo, se adquirió el miedo a través de la entrega de 5 ECs pareados con el ENC. Estas dos fases en conjunto pertenecieron a la etapa llamada **“adquisición del miedo”**. Al día siguiente se evaluó la actividad locomotora y la ansiedad en la prueba de campo abierto. Treinta minutos después se procedió a evaluar la evocación de la memoria de miedo en un contexto nuevo, llamado contexto B, y luego en el contexto original, llamado contexto A, a través de la entrega de 5 ECs, etapa que fue llamada **“evocación de la memoria de miedo I”**. La evaluación del comportamiento en el contexto B se realizó con el fin de evaluar si el comportamiento de freezing estuvo asociado al EC *per se* en un contexto diferente al usado durante la etapa de adquisición del miedo.

Luego de la etapa de la **“evocación de la memoria de miedo I”**, las ratas se dividieron en 2 grupos: control y estrés. Las ratas del grupo estrés fueron llevadas a una sala diferente, allí fueron sometidas a un protocolo de ECR durante 1 hora diaria por 7 días, desde el DPN 65 al 71. Durante este proceso se evaluó la ganancia de peso, tanto del grupo control como del grupo estrés. Al día siguiente del último día de estrés (DPN 72), se procedió a realizar una

segunda medición de la respuesta ansiosa y de la actividad locomotora en la prueba de campo abierto. Treinta minutos después se evaluó la evocación de la memoria miedo en el grupo control y estrés durante la aplicación de 5 ECs, tanto en el contexto B como en el contexto A, esta etapa fue llamada “**evocación de la memoria de miedo II**”. Un día después, en el DPN 73, se procedió a realizar una lesión electrolítica para dejar una marca de la ubicación de los electrodos en el cerebro. Finalmente, las ratas fueron sacrificadas bajo anestesia profunda usando isoflurano al 4%. Luego se extrajeron las glándulas adrenales y fueron pesadas (Anexo, Fig. 2). También se extrajeron los cerebros para su posterior tinción de Nissl con el fin de comprobar la ubicación de los AMEs (Anexo, Fig. 5).



Esquema 2. Diseño experimental. Línea de tiempo mostrando los experimentos que se llevaron a cabo.

8. Registros electrofisiológicos

Los PCL fueron registrados en la CPFdm de las ratas cuando estas evocaron la memoria de miedo y desarrollaron el comportamiento de freezing. También se registraron los PCL en los eventos de “no freezing”, los cuales correspondieron a comportamientos de movimiento no asociados al miedo como la locomoción, acicalamiento, olfateo, etc., así como también durante eventos de inmovilidad durante la fase de habituación. Todo esto con el objetivo de comparar las dinámicas de la potencia espectral de las oscilaciones cerebrales en las distintas etapas del paradigma del condicionamiento al miedo. La actividad oscilatoria de los PCL fue evaluada en el rango de frecuencia entre 0 y 100 Hz mediante el análisis de la densidad de la potencia espectral (DPE) (Jacinto y col, 2013; Jacinto y col., 2016).

9. Adquisición y análisis de datos

Para registrar los PCL se usó un sistema inalámbrico de adquisición de señales bioeléctricas (W2100, Multi Channel Systems MCS GmbH, Harvard Bioscience, Inc., Reutlingen, Alemania). Este sistema está compuesto por un headstage (15,5 x 15,5 x 5 mm) con un peso de 2,9 g (W2100-HS16, W2100, Multi Channel Systems MCS GmbH, Harvard Bioscience, Inc., Reutlingen, Alemania), el cual tiene 16 canales con un amplificador en el ancho de banda de 1 Hz a 5 kHz (ganancia de 101, impedancia de entrada de 1 G Ω , resolución de 16 bit, rango de entrada de voltaje de $\pm 12,4$ mV, entrada de ruido de $<1,9$ μ V_{RMS} y una distancia de enlace inalámbrico de 5 m) y una tasa de muestreo de 25 kHz. Los 16 pines del headstage forman el enchufe omnético tipo A79039-001, el cual es compatible con los AMEs utilizados en esta tesis. En la parte superior del headstage se acopló una batería (27,5 x 19,5 x 5 mm) de 8,1 g de peso y una potencia de 100 mAh (W2100, Multi Channel Systems MCS GmbH, Harvard Bioscience, Inc., Reutlingen, Alemania), lo que permitió el registro continuo de las señales bioeléctricas por más de 90 minutos. De esta manera, las señales bioeléctricas adquiridas a una tasa de 25 kHz dentro del headstage fueron amplificadas, digitalizadas y enviadas a través de un radiochip a un router (250 mm x 83 mm x 25 mm) (W2100, Multi Channel Systems MCS GmbH, Harvard Bioscience, Inc., Reutlingen, Alemania) en la frecuencia de banda de 2,4 Ghz. El router estuvo conectado a una tarjeta de interfaz (250 x 83 x 25 mm) con un peso de 300 g (MCS-IFB 3.0 Multiboot, W2100, Multi Channel Systems MCS GmbH, Harvard Bioscience, Inc., Reutlingen, Alemania) a través de un cable tipo eSATAp. La tarjeta de interfaz envió las señales bioeléctricas digitales al computador de adquisición a través de un cable USB 3.0 de súper velocidad. El software de adquisición fue la Suite de Multichannel (Multi Channel Systems MCS GmbH, Harvard Bioscience, Inc., Reutlingen, Alemania). En paralelo a la adquisición de datos, una señal TTL (transistor-transistor-logic), la cual llegó a la tarjeta de interfaz a través de un conector Lemo EPL 00250 NTN, fue utilizada para marcar la presencia de los ECs en la señal registrada por la Suite de Multichannel. De esta manera tanto el registro, el video de comportamiento y la entrega de los ECs estuvieron sincronizados. Finalmente, los datos adquiridos fueron almacenados en el formato NEX para su posterior análisis.

El análisis de la DPE y de los espectrogramas de perieventos de las señales registradas se realizó con el software Neuroexplorer 5 (Nex Technology, Madison, USA). De esta manera se evaluaron eventos ocurridos 30 s antes de la llegada del EC y 30 s durante la emisión del EC, para cada una de las fases y/o etapas descritas anteriormente en el paradigma del condicionamiento al miedo. Con el fin de que todos los datos fueran comparables, en el análisis de las dinámicas de la DPE de las oscilaciones de 1 a 4 Hz durante el comportamiento específico, se tomaron por cada rata 3 eventos de 2 s de freezing, inmovilidad y no freezing (movilidad), según sea el caso. Además, para observar el efecto de la velocidad de desplazamiento sobre la DPE de las oscilaciones de 1 a 4 Hz y de las oscilaciones theta de 6 a 10 Hz se tomaron 3 eventos de 2 s de alta y baja velocidad en la prueba de campo abierto (Esquema 1).

10. Densidad de la potencia espectral

Para cada variable continua seleccionada de la adquisición de señales bioeléctricas se calculó la potencia espectral a través del método multitaper (Prieto y col., 2007). En cada caso, se utilizó un periodograma de Welch: La matriz de datos original se dividió en segmentos de datos (o ventanas) de longitud $2 * N_f$ (donde N_f es el número de valores de frecuencia), superpuestos por D puntos. La superposición fue del 50%, por lo tanto, D fue $(2 * N_f) / 2 = N_f$. Para cada segmento, la señal fue previamente procesada con el parámetro de ventana “restar media”, que correspondió a: “Señal procesada $[i] = \text{Señal } [i] - \text{media de la señal en el segmento}$ ”. Después de que los datos se dividieran en segmentos superpuestos se les aplicó una función de ventana a los segmentos de datos individuales (es decir, Señal procesada “ventaneada” $[i] = \text{Señal procesada } [i] * \text{Valor de ventana } [i]$; se especifica la ventana por la función de ventana). La mayoría de las funciones de ventana proporcionan más influencia a los datos en el centro del segmento que a los datos en los bordes, lo que representa una pérdida de información. Para mitigar esa pérdida, los segmentos de datos individuales se superpusieron en el tiempo (como en el paso anterior). Posteriormente, el periodograma se calculó computando la transformada de Fourier discreta y luego calculando la magnitud al cuadrado del resultado. Los periodogramas individuales se promediaron en el tiempo, lo que

redujo la varianza de las mediciones de las potencias individuales. El resultado final fue un conjunto de mediciones de potencia versus "bin" de frecuencia. Finalmente, para la estimación espectral multitaper, se calcularon varios periodogramas (tapers) para cada segmento resultante. Cada taper se calculó aplicando una función de ventana especialmente diseñada (función Slepian). Todos los tapers para un segmento dado se promediaron para formar el periodograma del segmento. Estos periodogramas de segmentos individuales se promediaron en el tiempo.

Las señales de los registros fueron filtradas con un paso de banda entre los 0 y 100 Hz. Los electrodos con una calidad de señal pobre y/o con artefactos fueron visualmente identificados y eliminados del estudio. El número de valores de frecuencia utilizado fue de 65536, mientras que en el método multitaper el producto de ancho de banda del tiempo utilizado fue de 2 y el número de tapers fue de 3. El promedio de la DPE entre el rango de 1 a 4 Hz fue calculado para cada comportamiento descrito anteriormente. La normalización fue del porcentaje del total de la DPE, es decir, el espectro de la potencia se normalizó de modo que la suma de todos los valores del espectro fuera igual a 100.

11. Espectrograma de perieventos

Este análisis capturó el contenido de las frecuencias de las señales continuas en una ventana de tiempo alrededor de eventos de referencia, permitiendo observar las dinámicas de cambio del PCL respecto a sus propiedades espectrales en periodos específicos, en el caso de este trabajo, durante la transición al EC en cada una de las fases del condicionamiento al miedo. Así, para cada señal seleccionada se calculó el promedio de múltiples espectrogramas, correspondientes a cada evento especificado en la señal de referencia. La máxima frecuencia utilizada fue de 10000 Hz, mientras que los demás parámetros fueron similares a los utilizados en el análisis de la DPE: el número de valores de frecuencia fue de 65536, mientras que el producto de ancho de banda utilizado para el método multitaper fue de 2 y el número de tapers de 3. Las frecuencias mostradas para cada espectrograma estuvieron en el rango de los 0 a 12 Hz, y correspondieron a los 30 s antes del inicio del primer tono y a los 30 s durante la entrega del primer tono en cada una de las fases del condicionamiento al miedo.

12. Histología

Al finalizar los experimentos se realizó una lesión electrolítica con el objetivo de dejar una marca visible de la posición de los electrodos. Esta consistió de una corriente de 25 μ A por 20 s pasada por cada uno de los electrodos de los animales implantados. Para verificar la posición de los electrodos en la CPFdm, cada animal fue sacrificado con una anestesia de isoflurano al 4% e inmediatamente perfundido con una solución salina y paraformaldehído (PFA) al 4%. Cada cerebro fue extraído y mantenido en PFA al 4% en solución tampón fosfato salino 1X a un pH de 7,4. Después de una criopreservación en sacarosa al 30% por 72 horas, a través de un criostato Kedee KD-2950 (Zhejiang Jinhua Kedi Instrumental Equipment Co. Ltd, Zhejiang, China; gentilmente facilitado por el Dr. Ramón Sotomayor de la Universidad de Valparaíso) se realizaron cortes coronales de 50 μ m de grosor a -20°C. Cada corte fue teñido con cresilo violeta al 0,1 % y montado con Entellan-New (Merck, Alemania). Las lesiones fueron confirmadas a través de la observación en un microscopio de fluorescencia (Modelo H550L, Nikon, Tokio, Japón).

13. Análisis estadístico

Luego de la normalización de los datos sustrayendo el promedio de los electrodos, se realizó el análisis estadístico utilizando el programa GraphPad Prism v.7.0 (GraphPad Prism Software Inc, La Jolla, USA). Para llevar a cabo el análisis de comportamiento en el paradigma del miedo condicionado entre los grupos experimentales (control y estrés) se utilizó un ANOVA de dos vías de mediciones repetidas, donde la variable independiente fue cada uno de los ensayos o "trials", y la variable dependiente fue los porcentajes de freezing en cada uno de los ensayos de cada fase y/o etapa del condicionamiento al miedo. El mismo análisis fue realizado para evaluar el efecto del estrés en el peso diario. En este caso, la variable independiente fue los días que pasaron para el grupo control y los días de estrés para el grupo estrés y la variable dependiente fue el peso diario. Además, se realizó un post test de Bonferroni. Por otro lado, para comparar el comportamiento de freezing 30 s antes y 30 s durante la emisión del primer tono en el contexto B y en el contexto A, tanto 1 día después del condicionamiento al miedo, como en el grupo control y estrés, se utilizó un t-test pareado

(Anexo, Fig. 3). Para evaluar las diferencias del paso de los 7 días en el grupo control y los 7 días de ECR en el grupo estrés en la distancia total recorrida, la velocidad máxima alcanzada y en el tiempo en el centro de la prueba de campo abierto se procedió a realizar un t-test pareado.

Para observar si los datos de la DPE siguieron una distribución normal se realizó un análisis con la prueba Kolmogorov Smirnov. También, se realizó la prueba de Levene para observar la homocedasticidad de las varianzas. Estos análisis se realizaron con el programa IBM SPSS (IBM Corp, Nueva York, Estados Unidos). De este modo, se encontró que los datos tuvieron una distribución normal y las varianzas fueron homogéneas. Así, para comparar la DPE entre los eventos de no freezing y de freezing, tanto 1 día después del condicionamiento al miedo como 7 días después en el grupo control se realizó un t-test pareado, mientras que en el grupo estrés, donde eventos de freezing antes del inicio del tono fueron agregados, se procedió a realizar un ANOVA de mediciones repetidas de una vía con un *post hoc* test de Tukey. También se realizó un ANOVA de mediciones repetidas de una vía con un *post hoc* test de Tukey para comparar la DPE durante los periodos de inmovilidad en la habituación y de freezing en la adquisición del miedo condicionado (Anexo, Fig. 4). Para comparar el promedio de la DPE durante los eventos de freezing 1 día después del condicionamiento al miedo con el grupo control y estrés se realizó un t-test pareado. Además, para comparar las diferencias de la DPE entre los grupos control y estrés se utilizó un t-test no pareado. Para evaluar los efectos de la velocidad sobre la DPE en la prueba de campo abierto se utilizó t- test pareado. Finalmente, para comparar el peso de las glándulas adrenales entre el grupo control y estrés se realizó la prueba no paramétrica de Mann Whitney. La DPE fue representada como el promedio con el respectivo error estándar de la media (\pm), mientras que los resultados de la cuantificación de la DPE de las oscilaciones de 1 a 4 Hz fueron representados como el promedio con sus máximos y mínimos respectivos. Los niveles de probabilidad menores o igual a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

IV. RESULTADOS

1. Prueba de campo abierto

En las ratas del grupo control, tanto la distancia total recorrida ($p=0,943$) como la velocidad máxima de desplazamiento ($p=0,461$) no varió cuando esta se comparó con la situación de un día después del condicionamiento al miedo, como se observa en la figura 1 (A y B, azul). Respecto a los animales que fueron sometidos al ECR (Fig. 1A y B, rojo), se puede observar que tampoco existe una diferencia con la situación de 1 día después del condicionamiento al miedo en la distancia total recorrida ($p=0,446$) y la velocidad máxima alcanzada ($p=0,540$). Por lo tanto, el ECR no afectó la actividad locomotora de los animales implantados.

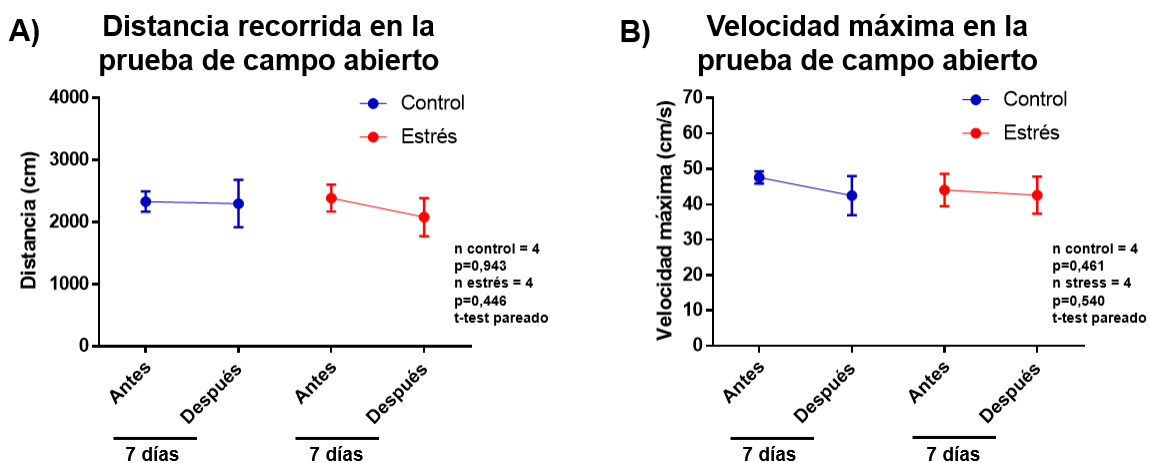


Figura 1. Actividad locomotora. Distancia total recorrida (A) y velocidad máxima alcanzada (B) en las ratas de los grupos control (azul) y estrés (rojo) respecto a la situación de un día después del condicionamiento al miedo. Para comparar las diferencias en el grupo control y estrés con la condición de 7 días antes se realizó un t-test pareado.

Al igual que las mediciones de la distancia total recorrida y la velocidad máxima alcanzada, el comportamiento ansioso, medido como el tiempo transcurrido en el centro de la prueba de campo abierto, no varió en el grupo control (Fig. 2B, izquierda y 2C, azul; $p=0,866$), como tampoco en el grupo estrés (Fig. 2B, derecha y 2C, rojo; $p=0,136$) cuando se comparó con el primer día después del condicionamiento al miedo.

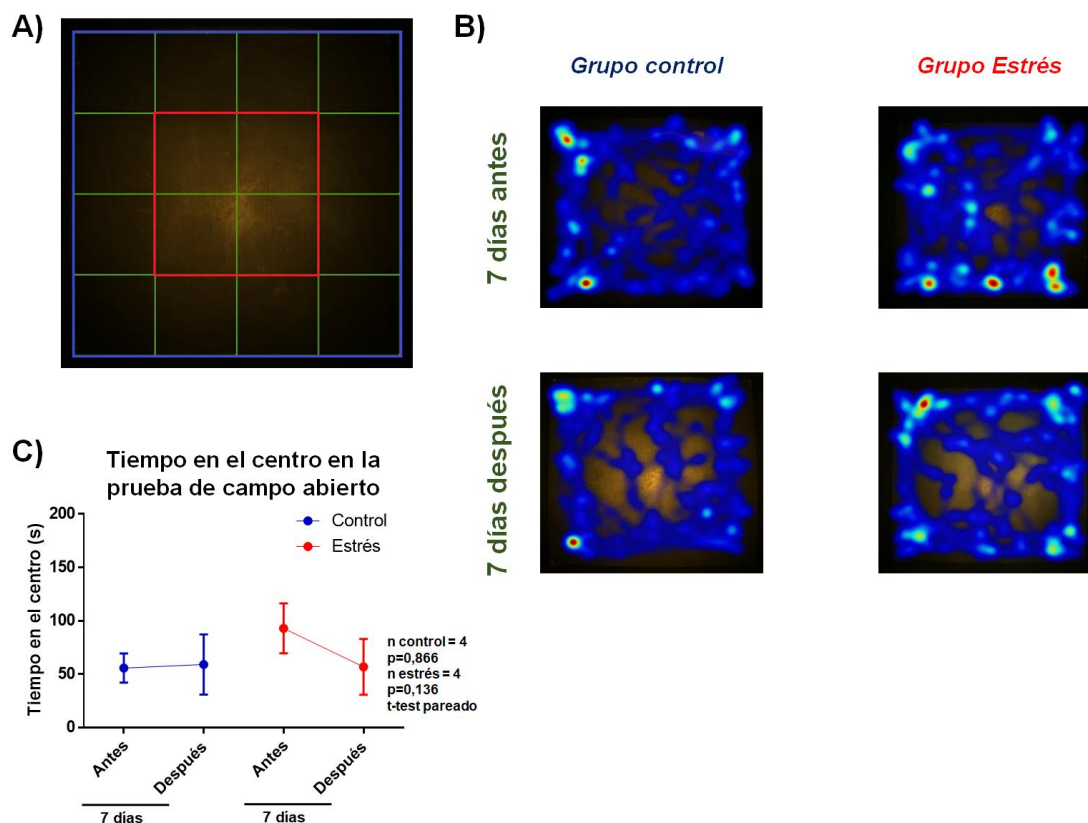


Figura 2. Comportamiento ansioso. Esquema que muestra la zona periférica (cuadrado exterior azul) y la zona central (cuadrado interior rojo) de la prueba de campo abierto (A). Mapas de actividad mostrando la cantidad de tiempo transcurrido en la periferia y en el centro de la prueba de campo abierto en el grupo control (B, izquierda abajo) y en el grupo estrés (B, derecha abajo), respecto a la situación de un día después del condicionamiento al miedo (B, arriba). Tiempo de permanencia (s) en el centro de la prueba de campo abierto que presentaron las ratas del grupo control (C, azul) y estrés (C, rojo) respecto a la situación de un día después del condicionamiento al miedo. Para comparar las diferencias en el grupo control y estrés con la condición de 7 días antes se realizó un t-test pareado.

2. Condicionamiento al miedo

Al evaluar el porcentaje de freezing en la etapa de “**adquisición del miedo**” (Fig. 3), se puede observar que las ratas mostraron bajos niveles de freezing durante la fase de la habituación (19,37%). Por otro lado, durante la fase de condicionamiento al miedo, las ratas alcanzaron altos niveles de freezing (84,64%) en el tono número 5. Al día siguiente, durante la etapa de “**evocación de la memoria de miedo I**”, las ratas mostraron elevados niveles de freezing, tanto en el contexto B (96,84% en el quinto tono), como en el contexto A (90,64% en el quinto tono).

Paradigma del miedo condicionado

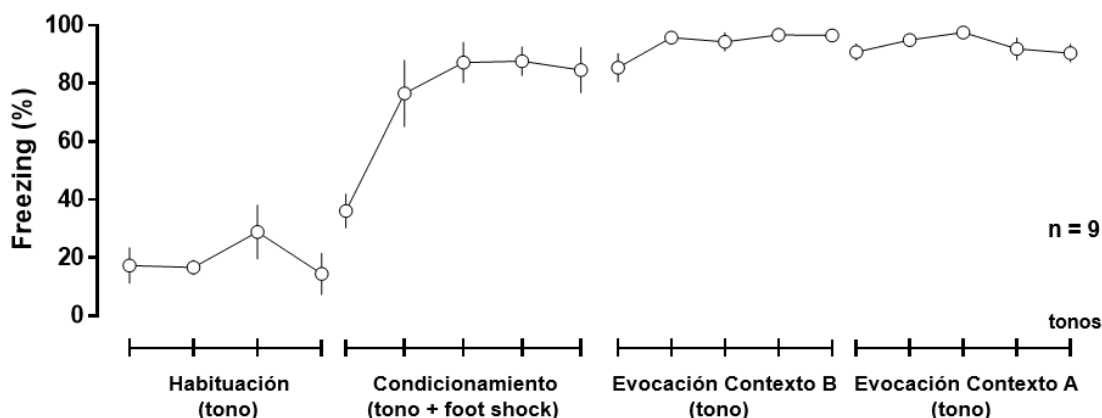


Figura 3. Porcentaje de freezing durante las etapas de “**adquisición del miedo**” (habitación y condicionamiento) y “**evocación de la memoria de miedo I**” (contexto B y contexto A) en las ratas implantadas con AMEs en la CPFdm.

Luego se evaluó los niveles de freezing en el grupo control y en el grupo estrés en la etapa “**evocación de la memoria de miedo II**” (Fig. 4). Ambos grupos mantienen porcentajes elevados de freezing en el contexto B (Fig. 4, izquierda), como se observó en el promedio de los 5 tonos (grupo control= 91,17%; grupo estrés= 90,6%). Además, no hubo un efecto significativo entre la interacción de los grupos y los ensayos ($F(4,24) = 0,839$; $p = 0,514$), como tampoco un efecto de los ensayos ($F(4,24) = 0,692$; $p = 0,605$), ni del ECR ($F(1,6) = 0,00703$; $p = 0,936$). Igualmente, en el contexto A (Fig. 4, derecha), los niveles de freezing fueron elevados cuando se promediaron los 5 tonos (grupo control= 66,39%; grupo estrés= 68,43%), mientras que la interacción de los grupos y los ensayos no fue significativa ($F(4,24) = 0,711$; $p = 0,593$). Tampoco hubo un efecto significativo de los ensayos ($F(4,24) = 1,87$; $p = 0,148$), ni del ECR ($F(1,6) = 0,0189$; $p = 0,895$).

Evocación de la memoria de miedo una semana después del condicionamiento al miedo

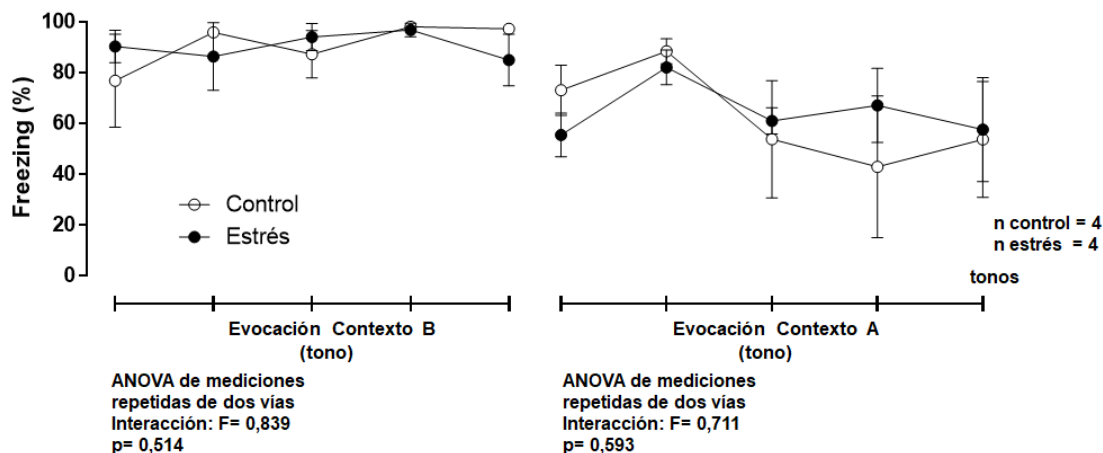


Figura 4. Porcentaje de freezing durante la etapa “evocación de la memoria de miedo II”. El promedio de las ratas del grupo control se representa en los círculos blancos y el de las ratas estresadas en los círculos negros. Para evaluar el efecto del estrés y de los ensayos en el porcentaje de freezing se realizó un ANOVA de dos vías de mediciones repetidas.

3. Oscilaciones cerebrales durante la evocación del miedo

Durante la habituación no existió una diferencia de la DPE en la actividad oscilatoria de baja frecuencia cuando se evaluaron los 30 s antes del inicio del cuarto tono respecto a los 30 s durante la entrega de este tono (Fig. 5A, arriba). Tampoco hubo un patrón de actividad oscilatoria clara durante los eventos de inmovilidad, como se puede observar en el espectrograma de frecuencia (Fig. 5A, abajo). En el primer tono de la fase del condicionamiento al miedo, en el cual todavía no se asoció el tono a la descarga eléctrica (ENC), no existió una diferencia en la DPE de la actividad oscilatoria de baja frecuencia entre los 30 s antes del inicio del tono respecto a los 30 s durante la entrega del tono (Fig. 5B, arriba), como se puede ver reflejado en el espectrograma de frecuencia (Fig. 5B, abajo). Sin embargo, en el quinto tono en la fase de condicionamiento al miedo, donde las ratas ya habían recibido cuatro ensayos de condicionamiento, se pudo observar cómo aparece un patrón claro en la actividad oscilatoria de baja frecuencia, aunque no hubo una diferencia de este patrón oscilatorio entre los 30 s antes del primer tono en comparación a los 30 s durante la entrega del quinto tono (Fig. 5C, arriba). Esta actividad oscilatoria se observó en el rango de los 1 a los 4 Hz (Fig. 5C, abajo).

Actividad oscilatoria en la CPFdm durante el condicionamiento al miedo

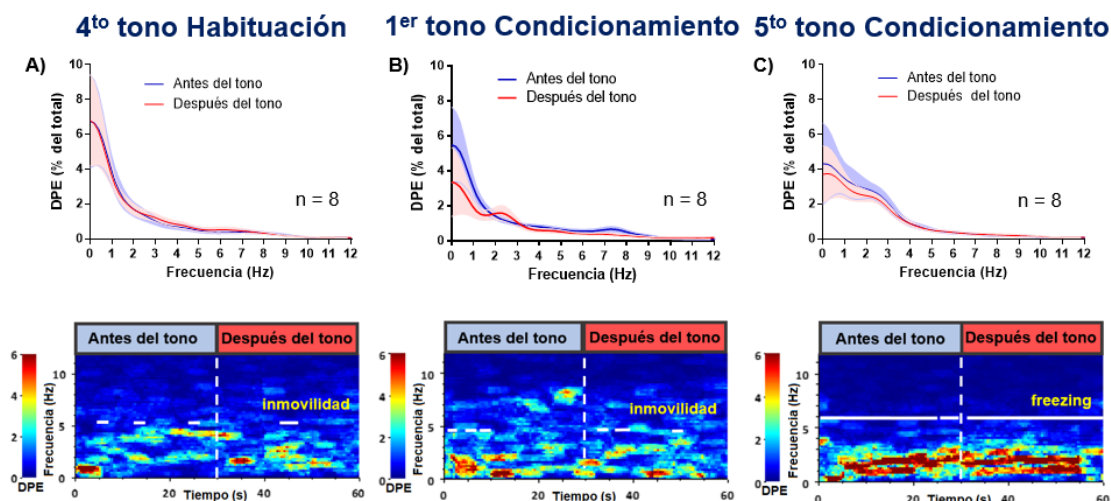


Figura 5. Actividad oscilatoria en la CPFdm durante las fases de habituación y condicionamiento en el paradigma del condicionamiento al miedo. DPE (arriba) y espectrogramas (abajo) obtenidos durante el cuarto tono de la fase de habituación (A) y el primer (B) y quinto (C) tono en la fase del condicionamiento al miedo, en el que fue asociado el EC con el ENC. El segmento de los análisis espectrales correspondió a los periodos de tiempo de 30 s antes y 30 s durante la entrega del tono. Las líneas blancas verticales y discontinuas en los espectrogramas representativas de tiempo y frecuencia marcan el inicio del tono y las líneas horizontales blancas los eventos de inmovilidad en A y en B y de freezing en C.

Cuando se analizó la DPE en el rango de 0 a 100 Hz durante el cuarto tono en la fase de habituación, la principal actividad oscilatoria de los PCL se encontró en las frecuencias bajas en el rango de los 0 a 12 Hz (Fig. 6A, izquierda). Igualmente, durante la etapa de la “**evocación de la memoria del miedo I**”, es decir, 1 día después del condicionamiento al miedo, la principal actividad oscilatoria se encontró entre los 0 a 12 Hz durante el primer tono, tanto para el contexto B (Fig. 6B, izquierda), como para el contexto A (Fig. 6C, izquierda). Este patrón de actividad oscilatoria se puede observar claramente en los espectrogramas de frecuencia representativos, tanto en la habituación (Fig. 6A, derecha), el contexto B (Fig. 6B, derecha) y el contexto A (Fig. 6C, derecha). Es importante destacar que estas oscilaciones se vuelven sostenidas al iniciar el tono durante la evocación del miedo en ambos contextos, como se puede apreciar a partir de la línea vertical blanca en los espectrogramas.

Actividad oscilatoria en la CPFdm durante la habituación y la evocación del miedo

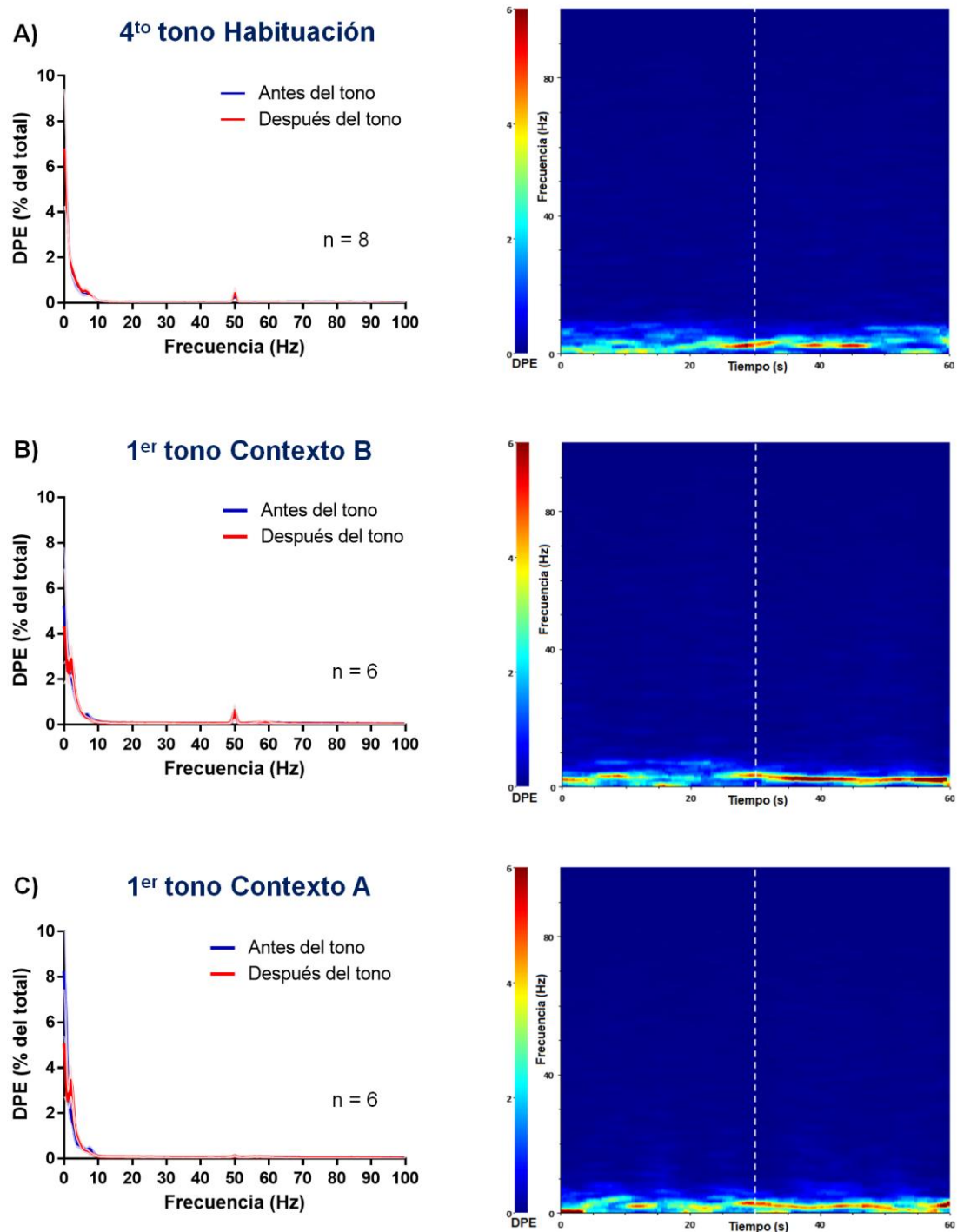


Figura 6. Actividad oscilatoria en la CPFdm durante las fases de habituación y la evocación de la memoria de miedo. DPE (izquierda) y sus espectrogramas representativos (derecha) en el cuarto tono de la fase de habituación (A) y el primer tono durante la evocación del miedo en el contexto B (B) y en el contexto A (C). El segmento de los análisis espectrales correspondió a los periodos de tiempo 30 s antes y 30 s durante la entrega del tono. La línea vertical blanca y discontinua en los espectrogramas representativos de tiempo y frecuencia marcan el inicio del primer tono.

Cuando se analizaron los espectrogramas de frecuencia en la etapa de la “**evocación de la memoria de miedo I**”, los eventos de freezing estuvieron preferentemente presentes desde el inicio del primer tono, tanto en el contexto B (Fig. 7C) como en el contexto A (Fig. 7F). Al hacer la comparación de la DPE entre los eventos de no freezing antes del primer tono (ver metodología, adquisición y análisis de datos) y de freezing durante el primer tono en esta etapa, se pudo observar durante los eventos de freezing un aumento de una banda oscilatoria en la frecuencia de 1 a 4 Hz, con un peak cercano a los 2 Hz, tanto en el contexto B (Fig. 7B y C) como en el contexto A (Fig. 7E y F). Cuando se evaluó la DPE se observó un aumento significativo de estas oscilaciones durante los eventos de freezing respecto a los eventos de no freezing en el contexto B (Fig. 7B; $t= 5,633$; $df= 16$; $p< 0,001$). En el contexto A igualmente hubo una diferencia significativa entre los eventos de freezing respecto a los eventos de no freezing relacionados a este patrón oscilatorio (Fig. 7E; $t=7,642$; $df= 16$; $p< 0,001$). También, durante los eventos de no freezing estuvieron presentes unas oscilaciones entre los 6 a 10 Hz correspondiente a las oscilaciones theta que se evocan durante la actividad locomotora (Fig. 7B y E, azul) (O'Neill y col., 2013; Jacinto y col., 2013; Jacinto y col., 2016).

Evocación de la memoria de miedo un día después del condicionamiento al miedo

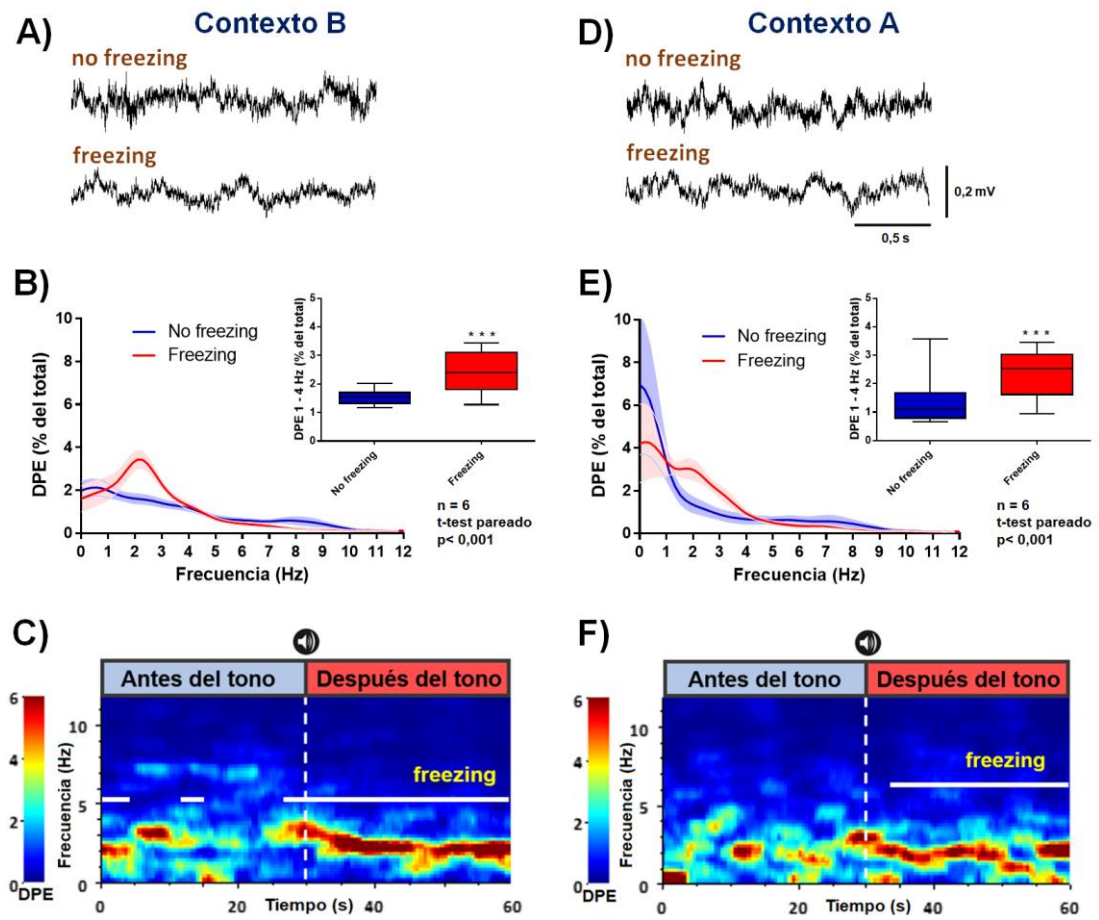


Figura 7. DPE de las oscilaciones de 1 a 4 Hz durante la “evocación de la memoria de miedo I”. Trazos representativos de los PCL adquiridos cuando las ratas no estuvieron en freezing antes del inicio del primer tono y en freezing durante el primer tono en el contexto B (A) y en el contexto A (D). DPE durante los eventos de no freezing antes del inicio del primer tono y de freezing en el primer tono con la respectiva cuantificación (recuadro) de la potencia espectral de las oscilaciones de 1 a 4 Hz, tanto para el contexto B (B), como para el contexto A (E). Espectrogramas de tiempo y frecuencia mostrando la transición al primer tono en el contexto B (C) y en el contexto A (F). La línea vertical blanca y discontinua en los espectrogramas representa el inicio del tono y la línea horizontal blanca los eventos de freezing. Para comparar la DPE entre los eventos de no freezing y de freezing se realizó un t-test pareado.

4. Efecto del ECR sobre las oscilaciones cerebrales de 1 a 4 Hz durante la evocación del miedo

Cuando se evaluó el peso después de la “**evocación de la memoria de miedo I**” durante los 7 días siguientes en las ratas del grupo control y los siete días de ECR en el grupo estrés, se encontró que hubo una interacción significativa entre estos grupos experimentales durante los días en que se evaluó el peso ($F(7,42) = 5,47$; $p < 0,001$) (Fig. 8A). Además, hubo un efecto significativo de los días en el peso $F(7,42) = 5,02$; $p < 0,001$, pero no del estrés ($F(1,6) = 0,308$; $p = 0,599$) (Fig. 8A). Estos resultados sugieren que los animales controles ganaron peso durante los 7 días en que las ratas del grupo estrés fueron sometidas al ECR. Cuando se realizó el análisis de comparaciones múltiples se encontró que en el grupo control hubo una diferencia significativa en el peso a partir del quinto día respecto al primer día ($p = 0,030$) (Fig. 8A), mientras que en el grupo estrés no hubo ninguna diferencia en el peso respecto al primer día en ninguno de los 7 días de estrés (Fig. 8A). Finalmente, cuando se comparó la diferencia de peso entre el primer y el último día en el grupo control, y el primer y último día de estrés en el grupo estrés, se encontró una reducción significativa del peso en el grupo estrés respecto al grupo control ($t = 2,651$; $df = 6$; $p = 0,038$) (Fig. 8B). Esto indica que el protocolo de ECR fue efectivo.

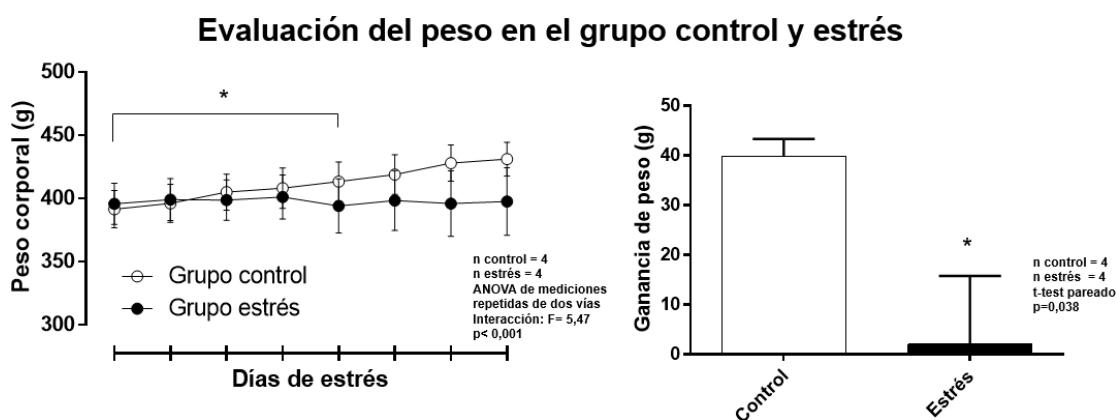


Figura 8. Evaluación del peso. Variación del peso durante los 7 días de aplicación del protocolo de estrés en el grupo control y estrés (izquierda). Diferencia entre el peso medido el último día de estrés respecto al primer día en el grupo control y estrés (derecha). Para evaluar el efecto del estrés y del paso de los días en el peso se realizó un ANOVA de dos vías de mediciones repetidas. Para comparar la diferencia de peso entre el último y el primer día de estrés entre el grupo control y estrés se realizó un t-test pareado.

Cuando se evaluó la diferencia en la DPE de la actividad oscilatoria en la banda de frecuencia entre los 1 a 4 Hz una semana después de la evocación del miedo condicionado, en la etapa de la **“evocación de la memoria de miedo II”**, se encontró un aumento en la DPE en este rango de frecuencia durante los eventos de freezing en el primer tono comparado con los eventos de no freezing antes del inicio de este, tanto en el contexto B (Fig. 9B; $t= 8,309$; $df= 16$; $p< 0,001$) como en el contexto A (Fig. 9E; $t= 7,689$; $df= 16$; $p< 0,001$). También, al igual que lo sucedido con el primer día después del condicionamiento al miedo, los eventos de freezing ocurrieron principalmente después del inicio del tono, tanto en el contexto B (Fig. 9C), como en el contexto A (Fig. 9F). Además, se puede observar que el peak de las oscilaciones de 1 a 4 Hz durante el freezing se desplazó a los 2,5 Hz aproximadamente (Fig. 9B y E, rojo). Finalmente, se visualizó un aumento de la potencia espectral en la banda de frecuencia entre los 6 y 10 Hz durante los eventos de no freezing respecto a la evocación del miedo un día después del condicionamiento (Fig. 7B y E, azul vs. Fig. 9B y E, azul).

Evocación de la memoria de miedo una semana después del condicionamiento al miedo en el grupo control

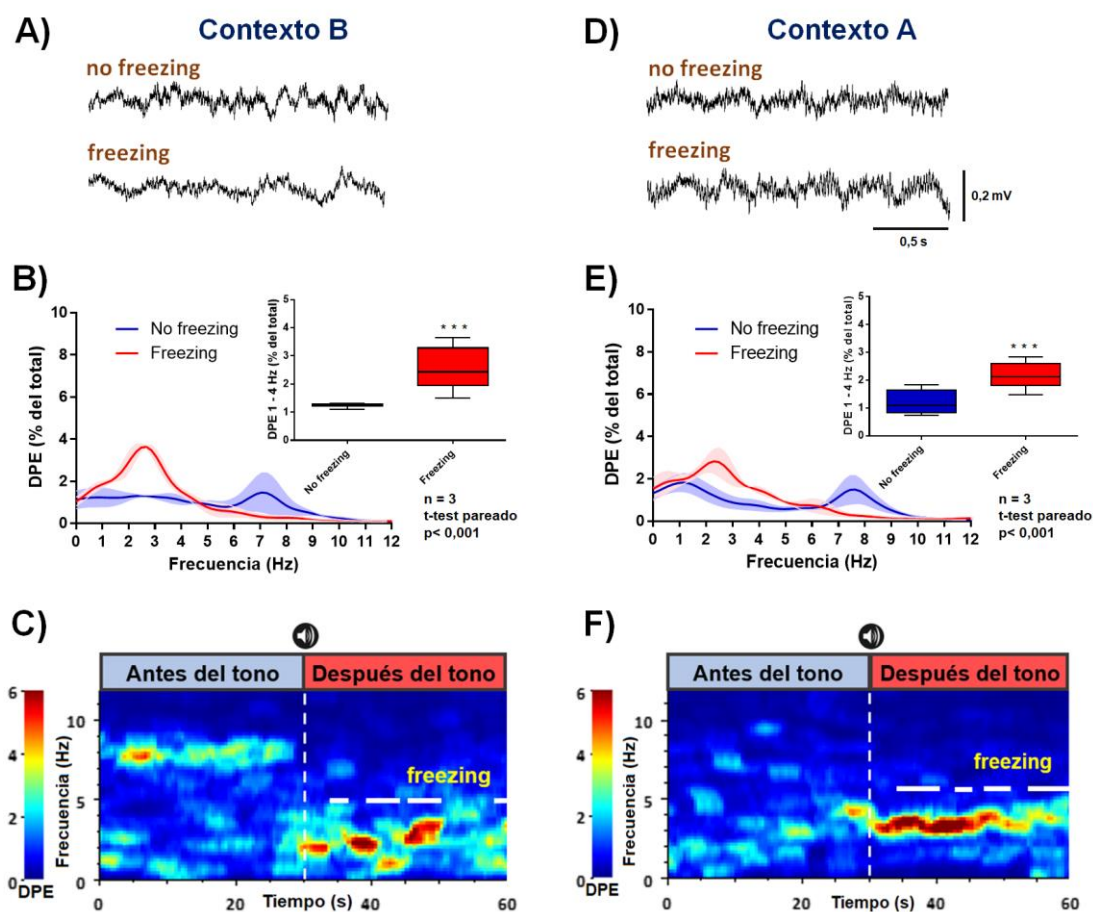


Figura 9. DPE de las oscilaciones de 1 a 4 Hz durante la “evocación de la memoria de miedo II” en el grupo control. Trazos representativos de los PCL adquiridos cuando las ratas no estuvieron en freezing antes del inicio del primer tono y en freezing durante el primer tono en el contexto B (A) y en el contexto A (D). DPE durante los eventos de no freezing antes del inicio del primer tono y de freezing en el primer tono con la respectiva cuantificación (recuadro) de la potencia de las oscilaciones de 1 a 4 Hz, tanto para el contexto B (B), como para el contexto A (E). Espectrogramas de tiempo y frecuencia mostrando la transición al primer tono en el contexto B (C) y en el contexto A (F). La línea vertical blanca y discontinua en los espectrogramas representa el inicio del tono y la línea blanca horizontal los eventos de freezing. Para comparar la DPE entre los eventos de no freezing y de freezing se realizó un t-test pareado.

Al inspeccionar los espectrogramas obtenidos cuando los animales fueron expuestos al primer tono después del protocolo de estrés, tanto en el contexto B (Fig. 10C) como en el contexto A (Fig. 10F), se puede apreciar que el comportamiento de freezing no siguió el patrón observado cuando estos animales fueron registrados 1 día después del condicionamiento al miedo (Fig. 7C y F), como tampoco al comportamiento observado en el grupo control (Fig. 9C

y F), mostrando eventos de freezing sostenidos antes del inicio del primer tono. Por esta razón, se decidió calcular la potencia espectral de los eventos de freezing antes y durante el primer tono, así como los eventos de no freezing antes del primer tono. El ANOVA de una vía mostró un efecto significativo en la DPE de las oscilaciones de 1 a 4 Hz después del ECR en los comportamientos de freezing y no freezing antes del primer tono y de freezing durante el tono en el contexto B (Fig.10B; $F(1,08, 17,3) = 39$; $p < 0,001$). Específicamente, hubo una mayor DPE de estas oscilaciones en los eventos de freezing antes del primer tono comparado con los eventos de no freezing antes del primer tono (Fig.10B; $q = 10,1$; $df = 16$; $p < 0,001$). Igualmente, hubo una mayor DPE en los eventos de freezing en el primer tono respecto a los eventos de no freezing antes del primer tono (Fig.10B; $q = 8,01$; $df = 16$; $p < 0,001$), mientras que no hubo diferencias entre los eventos de freezing antes y durante el primer tono (Fig.10B; $q = 2,9$; $df = 16$; $p = 0,132$). En el contexto A también se encontró un efecto significativo en la potencia espectral de las oscilaciones de 1 a 4 Hz en el grupo sometido al ECR en los comportamientos de freezing y no freezing antes del primer tono y de freezing durante el tono (Fig.10E; $F(1,23, 19,7) = 21$; $p < 0,001$). La DPE de estas oscilaciones fueron mayores en los eventos de freezing antes del primer tono comparado con los eventos de no freezing antes del primer tono (Fig.10E; $q = 6,61$; $df = 16$; $p < 0,001$). Sin embargo, no se encontró diferencias entre los eventos de freezing durante el primer tono respecto a los eventos de no freezing antes del primer tono (Fig.10E; $q = 3,2$; $df = 16$; $p = 0,090$). La DPE de las oscilaciones de 1 a 4 Hz fue mayor en los eventos de freezing antes del primer tono comparado con los eventos de freezing después del primer tono (Fig.10E; $q = 7,41$; $df = 16$; $p < 0,001$). Además, el peak de las oscilaciones de 1 a 4 Hz se observa en 2,5 Hz en el contexto B (Fig. 10B, naranja y rojo), mientras que en el contexto A se observa más cercano a 2 Hz en la situación de freezing antes del tono (Fig. 10E, naranja), mientras que no hay un peak visible en el freezing después del inicio del primer tono (Fig. 10E, rojo). Finalmente, se puede visualizar que las oscilaciones entre los 6 a 10 Hz son menores a las observadas a las de 1 día después del condicionamiento al miedo (Fig. 7B y E, azul vs. Fig. 10B y E, azul).

Evocación de la memoria de miedo una semana después del condicionamiento al miedo en el grupo estrés

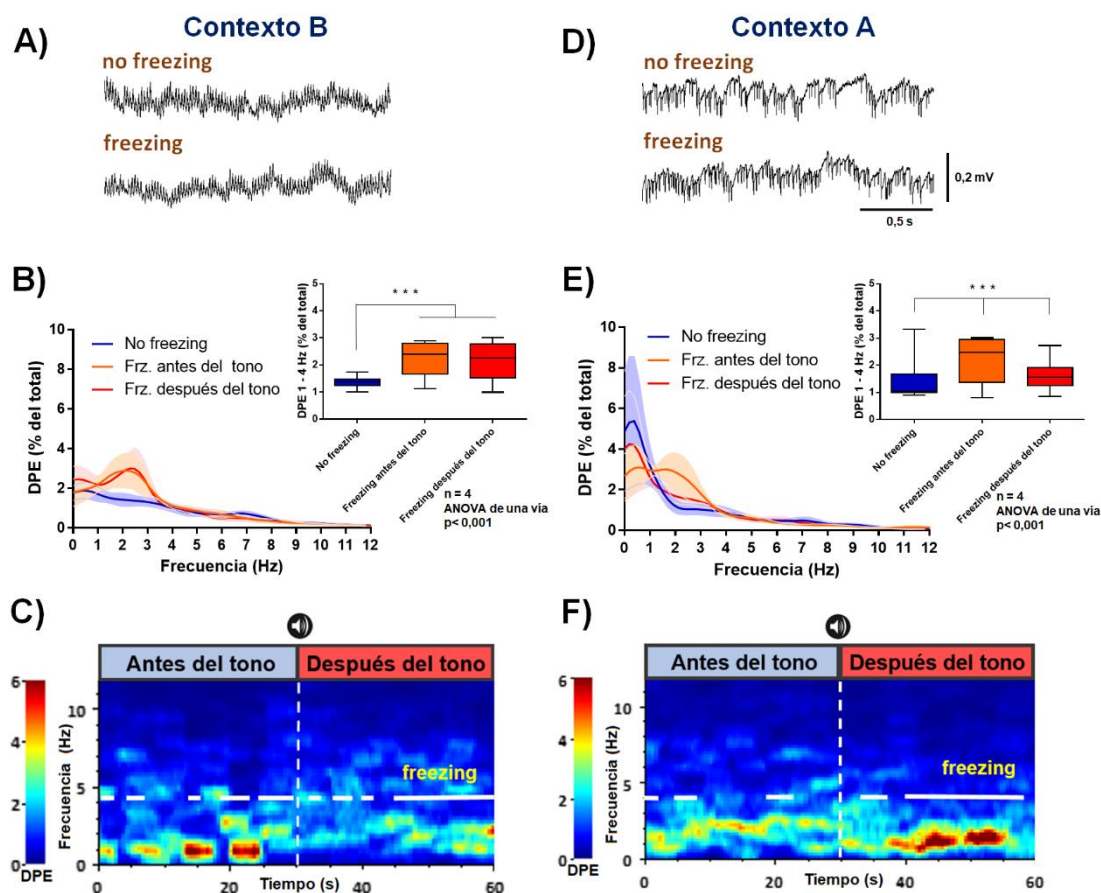


Figura 10. DPE de las oscilaciones de 1 a 4 Hz durante el “evocación de la memoria de miedo II” en el grupo estrés. Trazos representativos de los PCL adquiridos cuando las ratas no estuvieron en freezing antes del inicio del primer tono y en freezing durante el primer tono en el contexto B (A) y en el contexto A (D). DPE durante los eventos de freezing y de no freezing antes del inicio del primer tono y de freezing en el primer tono con la respectiva cuantificación (recuadro) de la potencia de las oscilaciones de 1 a 4 Hz, tanto para el contexto B (B), como para el contexto A (E). Espectrogramas de frecuencia mostrando la transición al primer tono en el contexto B (C) y en el contexto A (F). La línea vertical blanca y discontinua en los espectrogramas representa el inicio del tono y la línea blanca horizontal los eventos de freezing. Para comparar la DPE durante los eventos de no freezing y los eventos de freezing antes y después del tono se realizó un ANOVA de mediciones repetidas de una vía.

A continuación, se procedió a comparar la potencia espectral de las oscilaciones de 1 a 4 Hz en los eventos de freezing ocurridos en el primer tono durante la “evocación de la memoria de miedo II” en los grupos control y estrés con los eventos de freezing en el primer tono 1 día después del condicionamiento al miedo (Fig. 11). En el contexto B, el grupo control no mostró diferencias significativas en la DPE respecto al día después del condicionamiento (Fig. 11A, arriba; $t = 1,226$; $df = 16$; $p = 0,238$). En el grupo estrés hubo una disminución de la DPE

en los eventos de freezing cuando se comparó con los registros obtenidos 1 día después del condicionamiento al miedo (Fig. 11B, arriba; $t= 5,631$; $df= 16$; $p< 0,001$). En el contexto A no hubo diferencias en la DPE en el grupo control respecto a la situación de 1 día después del condicionamiento al miedo (Fig. 11A, abajo; $t= 1,129$; $df= 16$; $p= 0,276$). En contraste, el grupo estrés mostró una disminución de la DPE de las oscilaciones de 1 a 4 Hz cuando se comparó con los registros de 1 día antes del inicio del protocolo de estrés (Fig. 11B, abajo; $t=7,638$; $df=16$; $p< 0,001$).

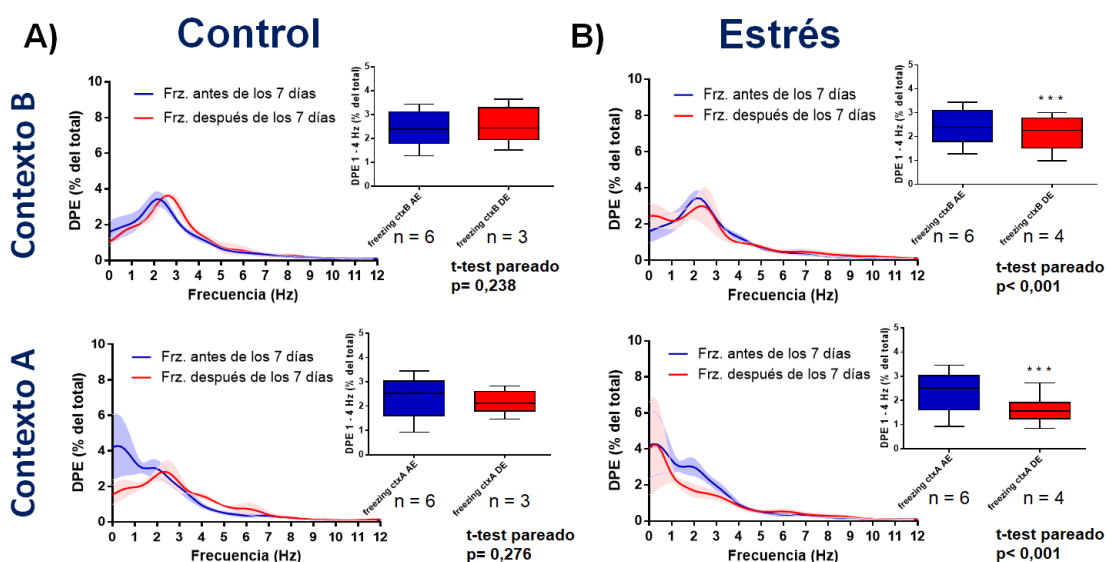


Figura 11. DPE de las oscilaciones de 1 a 4 Hz durante los eventos de freezing. Comparación de la DPE durante los eventos de freezing ocurridos durante el primer tono en la “evocación de la memoria de miedo II” en el grupo control (A) y en el grupo estrés (B) respecto a la DPE en los eventos de freezing ocurridos en el primer tono 1 día después del condicionamiento al miedo, tanto en el contexto B (arriba) como en el contexto A (abajo), con sus respectivas cuantificaciones (recuadros). Para comparar la DPE de los eventos de freezing del grupo control y estrés con la situación de 7 días antes en ambos contextos se procedió a realizar un t-test pareado.

Cuando se comparó la DPE de las oscilaciones de 1 a 4 Hz entre los grupos control y estrés durante el freezing evocado en el primer tono no se encontró una diferencia significativa en el contexto B (Fig. 12, izquierda; $t= 1,714$; $df= 32$; $p= 0,096$), mientras que en el contexto A, la potencia de estas oscilaciones fue menor en el grupo estrés respecto al grupo control (Fig. 12, derecha; $t= 3,499$; $df= 32$; $p< 0,001$).

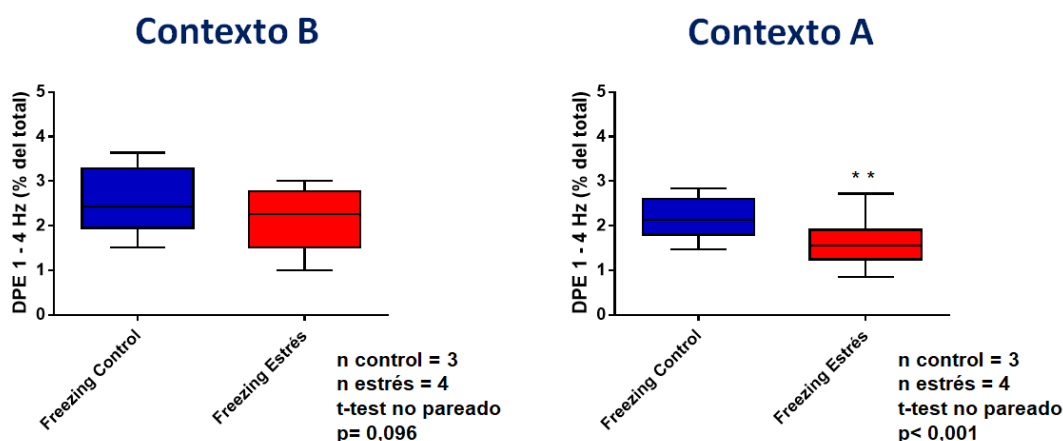


Figura 12. DPE de las oscilaciones de 1 a 4 Hz durante los eventos de freezing. Comparación de la DPE entre los grupos control y estrés durante los eventos de freezing en el primer tono durante la “**evocación de la memoria de miedo II**”, tanto en el contexto B (izquierda) como en el contexto A (derecha). Para comparar la DPE durante los eventos de freezing entre el grupo control y estrés se procedió a realizar un t-test no pareado.

5. Efecto de la velocidad de los animales implantados sobre las oscilaciones cerebrales relacionadas con la memoria de miedo

Las oscilaciones de tipo theta evocadas en el HPCd pueden ser moduladas por la velocidad de desplazamiento de los roedores (Vanderwolf, 1969; McFarland y col., 1975; Hinman y col., 2011; O’Neill y col., 2013; Jacinto y col., 2013; Jacinto y col., 2016). Sin embargo, estas oscilaciones no se han visto afectadas por la velocidad en estructuras como la CPFm, la ABL y el HPCv bajo paradigmas de familiarización en la prueba de campo abierto (Jacinto y col., 2013), durante la memoria de trabajo espacial en el laberinto en T (O’Neill y col., 2013), como tampoco durante la evaluación del riesgo en el laberinto elevado en cruz (Jacinto y col., 2016). Así, en este trabajo se observó si existe una modulación por parte de la velocidad de desplazamiento de los animales sobre la DPE de las oscilaciones de 1 a 4 Hz y de las oscilaciones theta que en esta tesis varió entre los 6 a 10 Hz. Para este fin se utilizó la prueba de campo abierto 30 minutos antes de la “**evocación de la memoria de miedo I**” y 30 minutos antes de la “**evocación de la memoria de miedo II**”, en los grupos control y estrés. Como se puede observar en la figura 13, no existe el peak característico de la DPE entre los 2 a 2,5 Hz durante las distintas velocidades de desplazamiento que si fue observado en las oscilaciones de 1 a 4 Hz en los eventos de freezing durante la evocación de la memoria de

miedo (Fig. 7, Fig. 9 y Fig. 10, B y E). Al comparar la cuantificación de la DPE de las oscilaciones entre los 1 a 4 Hz en la situación de 1 día después del condicionamiento al miedo, se observó que estas son mayores durante los eventos de baja velocidad (2,80 cm/s) respecto a los de alta velocidad (16,85 cm/s) (Fig. 13A y B, arriba; $t= 11$; $df= 16$; $p< 0,001$), mientras que la DPE de las oscilaciones theta no se vieron afectadas por la velocidad (Fig. 13A y B, abajo; $t= 0,293$; $df= 21$; $p= 0,773$). Al evaluar la DPE de las oscilaciones de 1 a 4 Hz en el grupo control no se observó una diferencia entre los eventos de alta velocidad (20,25 cm/s) y de baja velocidad (2 cm/s) (Fig. 13D y E, arriba; $t= 0,635$; $df= 16$; $p= 0,534$), en cuanto a la DPE de las oscilaciones de 6 a 10 Hz se observó que los eventos de baja velocidad tuvieron una menor potencia espectral que los de alta velocidad (Fig. 13D y E, abajo; $t= 9,18$; $df= 21$; $p< 0,001$). En el grupo estrés los eventos de baja velocidad (1,68 cm/s) tuvieron una mayor DPE en la frecuencia de 1 a 4 Hz que los eventos de alta velocidad (13,92 cm/s) (Fig. 13G y H, arriba; $t= 6,69$; $df= 16$; $p< 0,001$), mientras que en la DPE de la frecuencia de 6 a 10 Hz hubo una disminución leve pero significativa de los eventos de baja velocidad respecto a los de alta velocidad (Fig. 13G y H, abajo; $t= 2,34$; $df= 21$; $p= 0,030$).

Efecto de la velocidad en la actividad oscilatoria en la prueba de campo abierto

Un día después del condicionamiento al miedo

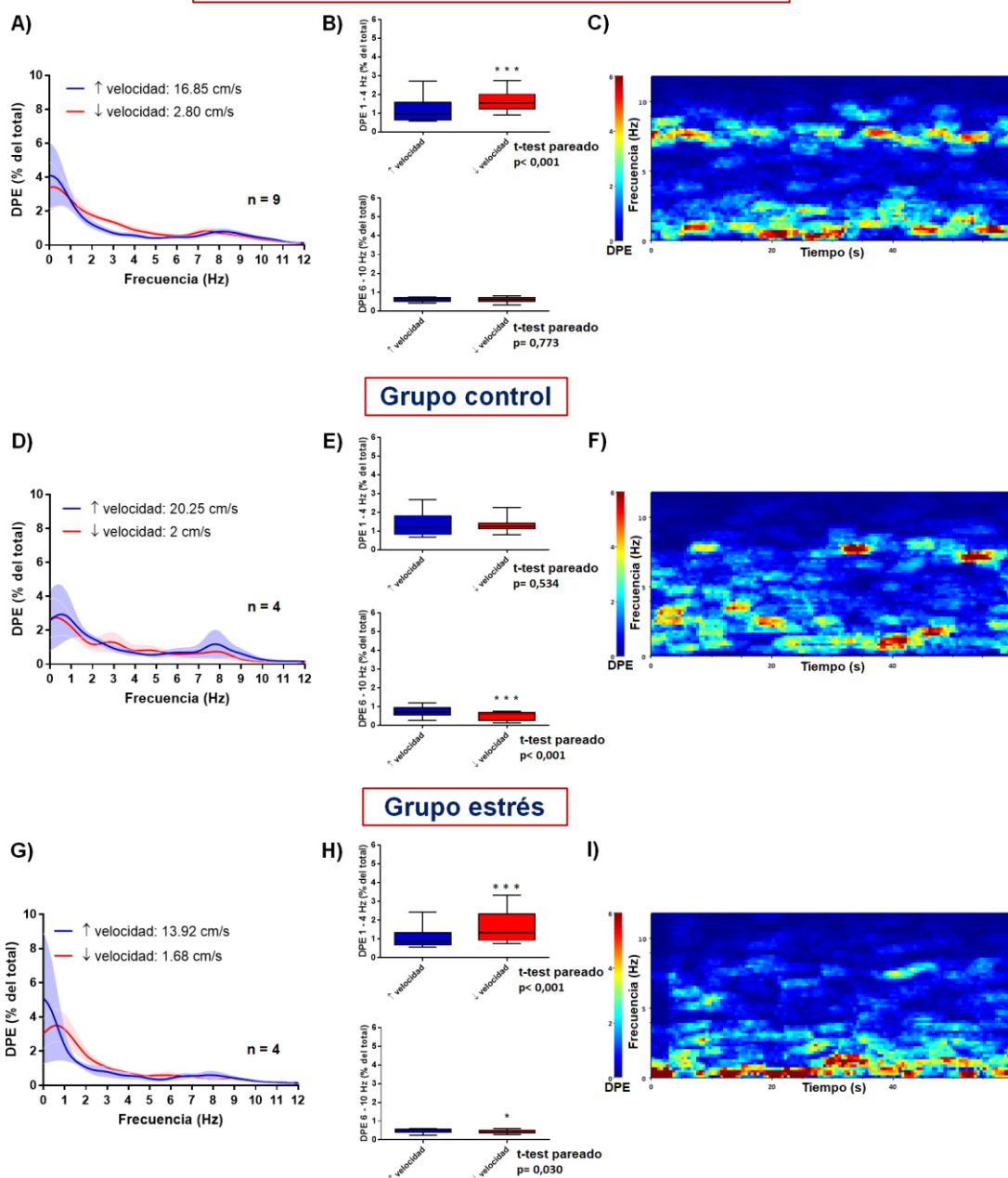


Figura 13. Efecto de la velocidad de desplazamiento sobre la actividad oscilatoria en la prueba de campo abierto. DPE en eventos de baja y alta velocidad 1 día después del condicionamiento al miedo (A) con la respectiva cuantificación de las oscilaciones de 1 a 4 Hz (B, arriba), de 6 a 10 Hz (B, abajo) y el espectrograma representativo (C). DPE en eventos de baja y alta velocidad en el grupo control (D) con la respectiva cuantificación de las oscilaciones de 1 a 4 Hz (E, arriba), de 6 a 10 Hz (E, abajo) y el espectrograma representativo (F). DPE en eventos de baja y alta velocidad en el grupo estrés (G) con la respectiva cuantificación de las oscilaciones de 1 a 4 Hz (H, arriba), de 6 a 10 Hz (H, abajo) y el espectrograma representativo (I). Los espectrogramas muestran momentos en los que hubo eventos de alta y baja velocidad en el lapso de 1 minuto. Para comparar la DPE durante los eventos de baja y alta velocidad se realizó un t -test pareado.

V. DISCUSIÓN

1. Condicionamiento al miedo y oscilaciones cerebrales en la CPFdm

En esta tesis se analizó el efecto del estrés crónico sobre la actividad neuronal en la CPFdm cuando las ratas evocaron la memoria de miedo a través del comportamiento freezing. El principal resultado que se obtuvo es que las ratas estresadas generalizan la memoria de miedo, lo cual se correlacionó con una disminución de la potencia espectral de las oscilaciones cerebrales registradas en una banda de frecuencia entre los 1 y 4 Hz, comparado con animales controles. Estos resultados sugieren que el deterioro que produce el estrés en la corteza prefrontal podría modificar el control que tiene esta estructura sobre la discriminación entre contextos o situaciones seguras y aversivas, favoreciendo que los animales estresados generalicen la memoria de miedo. Este tipo de alteraciones en la expresión de la memoria de miedo se observa en pacientes con TEPT (Orr y col., 2000; Blechert y col., 2007; Duval y col., 2015; Maren y Holmes, 2016).

Durante la fase de habituación no hubo eventos de freezing evocados por el tono. Sin embargo, se presentaron periodos de inmovilidad, los cuales fueron caracterizados por su poca duración, la mayoría de estos duraron menos de 2 s (Fig. 5A), su alto componente atencional, asociado a un comportamiento de orientación producto de la exposición de las ratas a un contexto nuevo, además de haber momentos de ajuste en la postura corporal, los cuales probablemente correspondieron a la redirección del cuerpo de las ratas a la posible fuente de peligro (Hagenaars y col., 2014). Es muy interesante destacar que en algunos momentos en que las ratas presentaron periodos de movilidad e inmovilidad durante la fase de habituación y durante el primer ensayo de la adquisición al miedo, cuando todavía no se asoció el EC al ENC, aparecen unas oscilaciones en la banda de frecuencia de 1,5 a 4 Hz, similares a las observadas durante el comportamiento de freezing (comparar Fig. 5A y B con Fig. 5C). Estas oscilaciones son mayores en su DPE durante los periodos de inmovilidad respecto a los periodos de movilidad (datos no mostrados). Sin embargo, la potencia espectral

de estas oscilaciones durante el freezing es mayor que durante la inmovilidad (Anexo, Fig. 4). Estos resultados no contradicen a los encontrados por Karalis y col., 2016, de hecho, en sus espectrogramas y cuantificaciones también se observa la aparición de oscilaciones en un rango de baja frecuencia, banda de 2 a 6 Hz u oscilación de 4 Hz para ese trabajo, durante la inmovilidad. Lamentablemente, ellos no cuantifican la diferencia de la potencia de estas oscilaciones de 4 Hz en la inmovilidad con los periodos de movilidad o “no freezing”. En su lugar, ellos calculan la relación señal/ruido de la media de la potencia de las oscilaciones en la banda de 2 a 6 Hz con la media de la potencia de las frecuencias fuera de la banda de 2 a 6 Hz. De esta manera, ellos obtuvieron una mayor relación señal/ruido durante la evocación del miedo que durante la habituación. En línea con esos resultados, en esta tesis no se observaron diferencias en la DPE de las oscilaciones de 1 a 4 Hz cuando se compararon los 30 s antes del primer tono respecto a los 30 s durante la entrega del tono, tanto en la habituación como en el primer ensayo de la adquisición de la memoria de miedo. Esto confirma que el tono *per se* no es un factor que produzca una respuesta de miedo en las ratas, como tampoco un aumento en las oscilaciones de miedo.

La aparición de las oscilaciones de baja frecuencia en roedores durante periodos de inmovilidad ha sido descrita en distintas estructuras corticales (Rojas-Líbano y col., 2018), incluyendo la CPFdm (Biskamp y col., 2017). Estas oscilaciones se sincronizan al ritmo respiratorio registrado en el bulbo olfatorio y se acoplan en fase a las oscilaciones del tipo theta (6 a 10 Hz) y gamma (40 a 100 Hz) de estructuras corticales como la CPFdm y el HPCv (Biskamp y col., 2017). Estas oscilaciones asociadas a la inmovilidad también se han encontrado en la CPFm de ratas anestesiadas con uretano, cuya sincronización con el HPCv e HPCd parece depender, al menos en parte, del núcleo reuniens del tálamo (Roy y col., 2017). Sorprendentemente, el trabajo de Moberly y col., 2018, encontró que, durante la evocación del miedo condicionado, tanto el ritmo respiratorio como los PCL del bulbo olfatorio oscilan en la banda de frecuencia de 2 a 6 Hz, con un peak en los 4 Hz. Estas oscilaciones en el bulbo olfatorio están acopladas en fase a las oscilaciones de 4 Hz de la CPFdm, lo que podría indicar un posible rol del ritmo respiratorio en la aparición de las oscilaciones de baja frecuencia asociadas al miedo. Además, la eliminación de las neuronas olfativas sensoriales

disminuye la DPE de las oscilaciones de 4 Hz en la CPFdm y su coherencia con el bulbo olfatorio, lo que resulta en una prolongación del freezing, indicando que los inputs olfatorios a la CPFdm podrían tener un rol en la expresión del miedo condicionado. Sin embargo, ninguno de los estudios citados hace una diferenciación entre las oscilaciones de baja frecuencia asociadas a la inmovilidad en la fase de habituación y al freezing asociado al miedo condicionado, por lo que estudios posteriores deberán dilucidar el rol de los ritmos respiratorios en estos comportamientos.

Durante la fase del condicionamiento al miedo se puede observar como a medida que van pasando los ensayos en los cuales el tono fue pareado con el footshock, las ratas van aumentando su porcentaje de freezing, llegando a tener aproximadamente un promedio de 80% de freezing durante la entrega del quinto tono (Fig. 3). Este incremento en el comportamiento de freezing también se puede notar antes de la llegada de los tonos (Fig. 5C), lo que indica el éxito de la asociación aversiva del tono con el footshock. Durante el condicionamiento al miedo el contexto cumple un rol fundamental, ya que, además de servir como una señal ambiental, es un modulador de la memoria (Urcelay y Miller, 2014). Es por este motivo que elegimos solo 5 ensayos de asociación del EC con el ENC con intervalos entre los ensayos de 60 a 180 s para evitar que el contexto compita con el EC, lo que hubiese sido más probable con duraciones de intervalos entre los ensayos constantes y de corta duración (Urcelay y Miller, 2014). También, para minimizar una posible generalización del miedo en el contexto donde el miedo fue adquirido (contexto A), se eligió una intensidad media baja de descarga eléctrica en las patas de los animales (0,5 mA) (Baldi y col., 2004; Ghosh y Chattarji, 2015). Durante los eventos de freezing en la fase de adquisición al miedo se puede observar como aparecen oscilaciones en la banda de frecuencia de los 1 a 4 Hz (Fig. 5C, abajo), sin embargo, como los eventos de freezing fueron sostenidos durante toda la adquisición del miedo (Fig. 5C, abajo), no se pudieron obtener diferencias en esta banda de frecuencia cuando se cuantificaron los 30 s antes del inicio de los tonos respecto a los 30 s durante la entrega de los tonos (Fig. 5C, arriba).

Al día siguiente de la fase del condicionamiento al miedo se evaluó la consolidación de la memoria de miedo, primero en un contexto nuevo, el contexto B, y luego en el contexto A.

Los resultados del comportamiento muestran que las ratas efectivamente tienen un aumento de los porcentajes de freezing durante la entrega de los tonos previamente asociados al footshock (Fig. 3). Esto indica que los animales consolidaron la asociación del EC con el ENC. Además, cuando las ratas fueron expuestas al contexto B no entraron en freezing sostenido hasta el inicio del primer tono (Fig. 7C y anexo Fig. 3), lo que indica que las ratas no presentaron ansiedad debido a la novedad del contexto. Después, cuando las ratas fueron puestas en el contexto A, tampoco presentaron freezing sostenido hasta el inicio del primer tono (Fig. 7F y anexo Fig. 3), lo que indica la especificidad del EC por sobre el contexto. En conjunto, estos resultados muestran que las ratas no generalizaron la expresión del miedo condicionado. Cuando se analizó la DPE de las oscilaciones de 1 a 4 Hz previamente observadas en la fase de condicionamiento al miedo, se encontró que estas aparecen en el momento en que las ratas entran en freezing, teniendo una mayor potencia espectral que en los eventos de no freezing o movilidad, tanto en el contexto B (Fig. 6B y Fig 7C), como en el contexto A (Fig. 6C y Fig. 7F). Además, se puede observar que durante los periodos de no freezing apareció un componente oscilatorio en el rango de los 6 a 10 Hz, el cual probablemente corresponde a las oscilaciones del tipo theta descritas durante la actividad locomotora en distintas áreas del cerebro incluyendo la CPFm (O'Neill y col., 2013; Jacinto y col., 2013; Jacinto y col., 2016).

Está documentado que el eje entre la CPFm, la ABL y el HPCv está involucrado en el procesamiento y expresión de las memorias de miedo (Bocchio y col., 2017). En este sentido, la expresión del miedo que se observa a través del comportamiento de freezing, se genera por la actividad coordinada del circuito de la CPFdm y la ABL (Karalis y col., 2016). Karalis demostró en ratones que la conducta de freezing está asociada a la sincronización del circuito de la CPFdm y la ABL a través de unas oscilaciones correspondientes a una banda de frecuencia de 2 a 6 Hz (con un peak en los 4 Hz), con una direccionalidad desde la primera hacia la segunda. Además, las neuronas putativas principales e inhibitorias de la CPFdm y de ABL se acoplaron a la fase de estas oscilaciones. Cuando se optoestimularon *in vivo* las neuronas PV+ de la CPFdm a 4 Hz, pero no de la ABL, se generó el comportamiento de freezing, el cual fue evocado el día siguiente en el contexto en el cual se realizó la

optoestimulación, destacando el rol preponderante de la CPFdm en la expresión del miedo (Karalis y col., 2016).

También, durante la evocación del miedo condicionado se ha observado el aumento de la potencia espectral y de la sincronización, tanto en correlaciones de la potencia como de fase, de las oscilaciones theta (4 - 12 Hz) entre la CIL, la AL y el área CA1 del hipocampo durante la entrega del tono previamente asociado al footshock (EC+) (Lesting y col., 2011; Likhtik y col., 2014). Además, en la ABL de ratones que son capaces de discriminar entre el EC+ y un EC no asociado al footshock (EC-), se encontró que durante el EC+ existe un acoplamiento de las oscilaciones gamma de alta frecuencia (70 - 100 Hz) con las oscilaciones theta locales, a pesar de que la potencia de estas oscilaciones gamma es menor que durante el EC- (Stujenske y col., 2014). Por el contrario, durante la emisión del EC-, señal que indica una situación de seguridad, estas oscilaciones gamma evocadas en la ABL se acoplan más fuertemente a las oscilaciones theta de la CPFm (Likhtik y col., 2014; Stujenske y col., 2014). La direccionalidad de este acoplamiento entre la actividad theta y gamma va desde la CPFm a la ABL, existiendo un aumento del acoplamiento del disparo (spikes) de las neuronas de la ABL a la fase de las oscilaciones theta de la CPFm (Likhtik y col., 2014; Stujenske y col., 2014). Interesantemente todos estos patrones de actividad no se observan en animales generalizadores del miedo, es decir, que no muestran diferencias en los niveles de freezing entre el EC+ y el EC- (Likhtik y col., 2014; Stujenske y col., 2014).

Las neuronas inhibitorias PV+ en la CPFdm controlan la expresión del miedo previamente condicionado (Courtin y col., 2014b). Cuando estas neuronas disminuyen su tasa de disparo (spikes) generan el comportamiento de freezing en ratones durante el EC+ (Courtin y col., 2014b). Además, esta inhibición de las neuronas PV+ en la CPFdm provoca un reseteo de fase y un aumento de la amplitud de las oscilaciones theta en esta estructura, acompañado de un aumento de la sincronización de las neuronas piramidales, lo que otorga una ventana de tiempo para enviar la información del EC+ a la ABL (Courtin y col., 2014b). De esta manera es probable que, durante el freezing, la inhibición de las neuronas PV+ desinhiba a las neuronas piramidales que sinaptan a las neuronas encargadas de la expresión del miedo en la ABL. Karalis y col., 2016, demostró que la optoestimulación de las neuronas PV+ a una

frecuencia de 4 Hz produce el comportamiento de freezing en ratones. Entonces es posible que la actividad de las neuronas PV+ a esta frecuencia oscilatoria esté involucrada en la generación del comportamiento de freezing y del correspondiente acoplamiento de las neuronas piramidales de la CPFdm y la ABL a las oscilaciones de 4 Hz, a la vez que son capaces de promover el reseteo de las oscilaciones theta (Courtin y col., 2014b). Futuros experimentos que mezclen optogenética y electrofisiología *in vivo* deberán apuntar a dilucidar las interacciones de estas distintas bandas de frecuencias durante el desarrollo del miedo condicionado.

Finalmente, es importante destacar que las oscilaciones theta no son las responsables directas del comportamiento de freezing observado en esta tesis, ya que estas oscilaciones son eventos que muestran un reseteo de fase en el inicio del EC+ y duran entre 100 a 300 ms (Courtin y col., 2014b). En cambio, las oscilaciones de 1 a 4 Hz observadas en esta tesis están relacionadas a los eventos de freezing, independientemente de si estos se generaron o no durante el tono, similar a lo observado con las oscilaciones de 4 Hz descritas por Karalis, las cuales no muestran un reseteo de fase (Karalis y col., 2016). Así, es probable que las oscilaciones theta estén relacionadas a eventos de percepción sensorial gatillada por los tonos y no al comportamiento de freezing *per se* (Bocchio y col., 2017).

2. Aspectos técnicos del modelo de estrés usado

Uno de los desafíos técnicos de esta tesis doctoral fue el diseño de un aparato para restringir el movimiento de las ratas implantadas sin afectar el AME que registra los PCL en la CPFdm durante la evocación de la memoria de miedo. Por ejemplo, si una rata implantada es puesta dentro de un restrictor de acrílico, existe una gran probabilidad de que el implante choque con las paredes de este y el AME se dañe. Entonces, se tendría que usar muchos controles para demostrar que la actividad neuronal adquirida no es un simple artefacto producto de los golpes en el implante. De esta manera, se creó un protocolo donde las ratas fueron restringidas de movimiento en todo su cuerpo, con excepción del cuello, lo que les dio la posibilidad de mover la cabeza. No es la primera vez que se realiza el registro de la actividad neuronal en ratas crónicamente estresadas en este tipo de paradigmas. En un trabajo de

Wilber y col., 2011, se realizó el análisis de la actividad neuronal en ratas implantadas que fueron primero estresadas para luego evaluar el efecto del estrés crónico sobre la actividad neuronal de la CPL e CIL durante paradigma del miedo condicionado. En cambio, en este trabajo primero se procedió a la adquisición y a la evocación del miedo y luego se separó a las ratas en los grupos control y estrés para evaluar las dinámicas de la DPE de las oscilaciones de 1 a 4 Hz.

Se eligió estresar a las ratas por 1 hora durante 7 días con el ECR por diferentes motivos: 1) En el trabajo de Cook y Wellman, 2004., los primeros 7 días de un protocolo de ECR de 21 días mostraron la reducción de peso y el aumento de la concentración sérica de CORT más pronunciada, 2) Inyecciones subcutáneas de CORT y del vehículo (aceite de sésamo) por 21 días producen efectos similares en la retracción de las dendritas apicales de las neuronas piramidales en las capas II y III de la CPFdm (Wellman, 2001), 3) Diez y 20 minutos de ECR por 1 semana producen los mismos efectos sobre la retracción dendrítica en las capas II, III y V de la CPFdm (Brown y col., 2005; Liu y Aghajanian, 2008) que protocolos de 3 y 6 horas de ECR por 3 semanas (Cook y Wellman, 2004; Radley y col., 2004; Radley y col., 2006). Además, se ha observado que después de un protocolo de ECR de 6 horas por 3 semanas, las neuronas piramidales de la capa II y III en la CPFdm tardan 3 semanas en recuperar su morfología (Radley y col., 2005). Esto nos indica que es probable que durante la evocación del miedo en el grupo estrés las neuronas piramidales CPFdm tuvieron retracción dendrítica en las capas II, III y V (Esquema 1, metodología).

De esta manera, en este trabajo se observó que las ratas estresadas no ganaron peso durante los 7 días de ECR (Fig. 8, izquierda), y, además, tuvieron una disminución en el peso en comparación al grupo control (Fig. 8, derecha), lo que indica la efectividad del ECR. Distintos protocolos de estrés, incluyendo el ECR, han mostrado que las ratas pierden peso y disminuyen la ingesta de comida (Martí y col., 1994; Harris y col., 1998). Por ejemplo, roedores sometidos a 3 horas de ECR por 3 días no recuperan el peso de los animales no estresados hasta 80 días después de finalizado el protocolo de estrés, a pesar de que la ingesta de comida se equipara respecto al grupo control (Rabasa y Dickson, 2016), lo que indicaría que en las ratas estresadas se establece un nuevo umbral de gasto energético (Rabasa y Dickson,

2016). Así, es posible especular que, durante los primeros días del estrés crónico, donde las ratas empiezan a experimentar una situación altamente traumática, la producción de catecolaminas como la adrenalina y noradrenalina aumentan generando un gasto energético mayor, lo que implica una disminución del peso. Además, es importante destacar que otro marcador del estrés como el aumento de la CORT (Harris y col., 1998; Cook y Wellman, 2004; Jeong y col., 2013), podría ejercer un rol catabólico a nivel de tejido hepático, adiposo y neuronal (Rabasa y Dickson, 2016). El aumento sostenido de CORT plasmático a través de todas las sesiones de estrés podría producir un déficit en el control del feedback negativo sobre el eje HPA, promoviendo los mecanismos anorexigénicos responsables de la disminución del peso. Consistente con esto, bajo protocolos de estrés crónico el eje HPA se vuelve hiperactivo, lo que produce un aumento de los péptidos como el CRF y las urocortinas, que son conocidos por tener efectos anorexigénicos (Rabasa y Dickson, 2016). Estos factores además pueden interactuar en el hipotálamo con péptidos orexigénicos como el neuropéptido Y, la proteína r-agoutí y la grelina, y, con factores anorexigénicos como el péptido pro-opiomelanocortina y la hormona leptina, promoviendo un nuevo equilibrio energético en los animales estresados (Jeong y col., 2013).

3. Evocación de la memoria de miedo en las ratas implantadas con AMEs

Las ratas implantadas del grupo control y estrés no mostraron una disminución del comportamiento de freezing cuando este fue cuantificado una vez concluido el periodo de estrés, en comparación con el nivel de freezing que mostraron estos animales 1 día después del condicionamiento al miedo. En otras palabras, se debe explicar porque no ocurrió la extinción de la memoria del miedo en los animales implantados. En el paradigma del miedo condicionado clásico, se expone varias veces solo al tono a los animales que fueron condicionados al miedo con el objetivo de que se genere un nuevo aprendizaje, no tenerle miedo al tono, esta es la base de la extinción al miedo condicionado. En la experiencia de años que tiene nuestro laboratorio en el estudio del miedo condicionado, se necesita más de 15 ensayos de extinción para disminuir el freezing a menos del 20 % y así entrar a la fase de extinción (Negron-Oyarzo y col., 2014). En los experimentos de esta tesis, el freezing no

disminuyó al 20 % en las ratas implantadas cuando estas fueron expuestas solo al tono, tanto 1 y 7 días después del condicionamiento al miedo. En otras palabras, estos animales no generaron el nuevo aprendizaje para consolidar la memoria de extinción y por eso mostraron altos niveles de freezing cuando fueron expuestos solo al tono después del condicionamiento al miedo.

De esta manera, es necesario comprender la dinámica de las conexiones sinápticas entre la CPFm, la ABL y el HPCv durante el desarrollo del miedo condicionado para entender los efectos del estrés en el comportamiento con las dinámicas oscilatorias subyacentes observadas en esta tesis. La CPFm recibe diferentes proyecciones intracorticales desde la ABL (Little y Carter, 2013; Cheriyan y col., 2016). Por ejemplo, la capa II de la CPL recibe la mayor parte de sus aferencias excitatorias provenientes desde la ABL en comparación a la capa II de la CIL. Luego, desde esta capa se envían proyecciones excitatorias e inhibitorias polisinápticas a la capa V de la CPFm. Es importante destacar que las proyecciones desde la capa II son principalmente cortico-amigdalares (Cheriyan y col., 2016). Por otro lado, la capa V de la CIL, la cual conecta a la CPFm con la AC y la SGP, recibe proyecciones principalmente excitatorias monosinápticas y en menor grado inhibitorias polisinápticas por parte de la ABL (Cheriyan y col., 2016). También, se ha encontrado que, durante la evocación del miedo contextual, un porcentaje de neuronas piramidales del HPCv proyecta a través de axones colaterales simultáneamente a la CPL y a la ABL, produciendo corrientes excitatorias monosinápticas e inhibitorias polisinápticas en ambas áreas (Kim y Cho, 2017). Es probable que las corrientes polisinápticas inhibitorias en la CPL de la CPFm sean establecidas por las neuronas PV+, ya que estas son mayormente sinaptadas desde el HPCv y la ABL en comparación a otras neuronas inhibitorias (Gabbott y col., 2002; Gabbott y col., 2006). Además, la CIL tiene conexiones con un grupo de neuronas gabaérgicas localizadas entre la ABL y la AC llamadas neuronas intercaladas, las cuales parecen ser claves para la expresión de la memoria de extinción, ya que su activación inhibe a la AC, por ende, al comportamiento de freezing (Maroun, 2013; Cho y col., 2013; Giustino y Maren, 2015).

Así, en esta tesis, es probable que en las ratas controles haya una excitabilidad sináptica aumentada desde la capa II de la CPL a la ABL, mientras que la CIL no puede dirigir una

potenciación a largo plazo con las neuronas intercaladas para establecer la memoria de extinción (Cho y col., 2013). En este sentido, ha sido reportado que una pobre memoria de la extinción está correlacionada con un aumento de la tasa de disparo de las neuronas piramidales de la CPL (Burgos-Robles y col., 2009). El desarrollo del miedo condicionado también depende de la integridad de la ABL y el HPCv. Por ejemplo, durante la evocación del miedo condicionado, la ABL podría estar activando a las neuronas piramidales de la capa II de la CPFm (Sotres-Bayon y col., 2012), la cual traspasaría la información a la capa V, que posteriormente permitiría el comportamiento de freezing a través de sus conexiones con la AC y la SGP. En cuanto al HPCv, es probable que durante la evocación del miedo condicionado esté modulando a la CPL a través de la inhibición polisináptica de las neuronas piramidales de la capa II por intermedio de las neuronas PV+ (Sotres-Bayon y col., 2012), otorgando a las ratas controles su capacidad de discriminar a los contextos como no aversivos (Fig. 9C y F y anexo, Fig. 3).

4. Efecto del estrés sobre las oscilaciones cerebrales de la memoria de miedo

Cuando se comparó los niveles de freezing 30 s antes del inicio del primer tono respecto a los 30 s durante el primer tono, se pudo observar que las ratas estresadas generalizaron más el miedo respecto a los animales controles, que entraron en freezing mayormente después del inicio del primer tono, tanto en el contexto B como en el contexto A, aunque esta diferencia no alcanzó a ser significativa, debido probablemente al n experimental (Anexo, Fig. 3). Esta observación es consistente con los síntomas de los pacientes con TEPT, que evocan continuamente las memorias aversivas de un trauma, incluso en contextos no asociados a este (Pitman y col., 2012; Maren y Holmes, 2016). Además, los pacientes con TEPT presentan un estado de hiperalerta constante (Pitman y col., 2012), fenotipo observado en las ratas estresadas en esta tesis.

Luego de que las ratas fueron sometidas al ECR, las oscilaciones en la banda de frecuencia de 1 a 4 Hz encontradas en esta tesis disminuyeron en su potencia espectral durante el comportamiento de freezing en el primer tono respecto al freezing expresado antes del inicio de este. Además, no hubo una diferencia en la potencia espectral de las oscilaciones de 1 a

4 Hz durante el freezing en el tono en comparación a los eventos de no freezing. Esta diferencia ocurrió solamente en el contexto original en el cual la memoria de miedo fue adquirida (contexto A), ya que en el contexto B la potencia de las oscilaciones de 1 a 4 Hz fue mayor, tanto en el freezing expresado antes del inicio del primer tono, como en el freezing evocado durante el tono respecto a los eventos de no freezing. Estos resultados indican que, en las ratas estresadas, la disminución de la potencia de las oscilaciones de 1 a 4 Hz podría generar una pérdida del control de la CPFdm sobre la ABL y el HPCv, lo que provocaría una generalización del miedo. En apoyo a esta idea, se ha encontrado que el balance entre la excitación e inhibición es fundamental para que la CPFm pueda ejercer sus funciones como la regulación emocional (McKlveen y col., 2019; Page y Coutellier, 2019). Por ejemplo, hay un desbalance hacia una mayor inhibición sobre la excitación en pacientes con depresión y TEPT, lo que podría ser explicado por el hecho de que el número y la morfología de las neuronas PV+ no se ven afectados bajo protocolos de estrés crónico (McKlveen y col., 2019; Page y Coutellier, 2019).

Interesantemente, cuando se comparó en las ratas estresadas la potencia de las oscilaciones de 1 a 4 Hz durante la evocación del miedo generada por el primer tono respecto a la situación de 1 después del condicionamiento al miedo, se encontró una disminución de esta en ambos contextos (Fig. 11B). Así, aunque no hubo un cambio en el contexto B en la potencia de las oscilaciones de 1 a 4 Hz durante el freezing evocado por el tono en comparación a lo observado en el contexto A, existe en ambos contextos una disminución de la potencia de las oscilaciones de 1 a 4 Hz respecto a la situación del 1 día después del condicionamiento al miedo. Además, cuando se comparó la potencia de las oscilaciones de 1 a 4 Hz de las ratas estresadas con el grupo control, se encontró una menor potencia de este patrón oscilatorio en el grupo estrés en el contexto A (Fig. 12). En conjunto, estos resultados muestran que el estrés crónico produce una disminución de la potencia de estas oscilaciones de baja frecuencia en la CPFdm y que este fenómeno está correlacionado a una generalización del miedo, principalmente en el contexto donde se adquirió esta memoria. Estos cambios posiblemente involucren una pérdida del control de la CPFdm en su capacidad de discriminar señales aversivas como el EC de señales seguras como un contexto no asociado al EC como

el contexto B. Además, la disminución de la potencia de estas oscilaciones correlacionadas a la generalización del miedo está en línea con lo observado en el trabajo de Moberly y col., 2018, quienes demostraron que una disminución de la potencia de las oscilaciones de 4 Hz está asociada con una persistencia del comportamiento de freezing, aunque ellos estudiaron el efecto de la interrupción de la vía olfatoria a la CPFdm sobre la dinámica de la potencia de las oscilaciones de 4 Hz. En la misma línea argumental, se demostró una sincronización de las oscilaciones theta y gamma entre la CPFm, la ABL y el hipocampo en situaciones contextuales que son percibidas como seguras (Lesting y col., 2011; Lesting y col., 2013; Likhtik y col., 2014; Stujenske y col., 2014). Por ejemplo, durante la evocación de la memoria de extinción (Lesting y col., 2011; Lesting y col., 2013), en la periferia de la prueba de campo abierto de roedores ansiosos (Likhtik y col., 2014; Stujenske y col., 2014) y durante la entrega del EC- (Likhtik y col., 2014; Stujenske y col., 2014). Además, en todas estas situaciones existe una direccionalidad, tanto en las oscilaciones theta como de las oscilaciones gamma, desde la CPFm hacia la ABL (Likhtik y col., 2014; Stujenske y col., 2014). Así, es probable que en las ratas estresadas de esta tesis ocurra un cambio de direccionalidad de las oscilaciones de 1 a 4 Hz y sea la ABL la que tome el control por sobre la CPFm sobre la discriminación del miedo, llevando a una generalización de esta memoria.

Esta disminución de la potencia espectral de las oscilaciones de 1 a 4 Hz está en concordancia con el trabajo de Wilber y col., 2011, donde se encontró que las ratas estresadas crónicamente mostraron una disminución del número de neuronas excitadas respecto a las ratas no estresadas en la CPL durante el condicionamiento al miedo. También, los trabajos que muestran que el estrés crónico reduce los potenciales post sinápticos excitatorios en la CPFm (Negrón-Oyarzo y col., 2014; Chattarji y col., 2015; Negrón-Oyarzo y col., 2016) y las corrientes post sinápticas excitatorias producidas por serotonina y orexina (Liu & Aghajanian, 2008) están en concordancia con los resultados de esta tesis. Además, el estrés crónico disminuye la potenciación a largo plazo en las sinapsis del tálamo medio dorsal y del hipocampo a la CPFm (Popoli y col., 2011; Negrón-Oyarzo y col., 2016). Todos estos descubrimientos podrían ser explicados por la retracción dendrítica y/o pérdida de las espinas de las neuronas piramidales señaladas anteriormente (Cook & Wellman, 2004; Radley y col.,

2004; Brown y col., 2005; Radley y col., 2005; Radley y col., 2006; Liu y Aghajanian, 2008). En resumen, todos estos factores podrían ser la causa de la disminución de las oscilaciones de 1 a 4 Hz en la CPFdm de las ratas estresadas en esta tesis.

5. Efecto de la velocidad de desplazamiento de los animales implantados sobre las oscilaciones de la memoria de miedo

Se ha descrito que las oscilaciones theta en el HPCd pueden ser moduladas por la velocidad de desplazamiento, mostrando una mayor potencia espectral a una mayor velocidad (Vanderwolf, 1969; McFarland y col., 1975; Hinman y col., 2011; O'Neill y col., 2013; Jacinto y col., 2013; Jacinto y col., 2016). Así, en esta tesis se evaluó si las oscilaciones de 1 a 4 Hz relacionadas con la evocación del miedo pueden ser moduladas por la velocidad de desplazamiento de los animales. Como el rango de diferencia de velocidades mostrado por las ratas es bajo en la caja de condicionamiento, evaluamos esta posible modulación en la prueba de campo abierto. Sin embargo, las ratas no mostraron episodios de freezing durante el transcurso de esta prueba, tanto un día después del condicionamiento al miedo, como tampoco en los grupos control y estrés. Es por este motivo que el análisis fue realizado midiendo los componentes espectrales de 1 a 4 Hz durante periodos de baja y alta velocidad. Las oscilaciones de 1 a 4 Hz con el peak característico entre los 2 a 2,5 Hz encontrada en esta tesis no aparecieron durante los eventos de movilidad de distintas velocidades en la prueba de campo abierto. Sin embargo, se puede observar que al contrastar los eventos de baja velocidad con los de alta velocidad aparece un componente espectral de baja frecuencia de 1 a 5 Hz. Esta banda de frecuencia tiene una mayor DPE que los eventos de alta velocidad, tanto 1 día después al condicionamiento al miedo, como en el grupo estrés. Mientras que en el grupo control esta diferencia desaparece. En contraste, en el grupo control la DPE de las oscilaciones de 1 a 4 Hz durante la evocación de la memoria de miedo a través del freezing es mayor en comparación a los eventos de movilidad en ambos contextos. Estos resultados indican que las oscilaciones entre los 1 a 4 Hz no son moduladas por la velocidad, mas bien, estas aparecen específicamente durante periodos de inmovilidad con un alto componente emocional aversivo como el freezing.

Las oscilaciones theta de 6 a 10 Hz encontradas en esta tesis en la CPFdm no son moduladas por la velocidad de desplazamiento un día después del condicionamiento al miedo. Esto está en concordancia con lo descrito en otros trabajos bajo distintos paradigmas conductuales como el de familiarización en la prueba de campo abierto (Jacinto y col., 2013), durante la memoria de trabajo espacial en el laberinto en T (O'Neill y col., 2013) y durante la evaluación del riesgo en el laberinto elevado en cruz (Jacinto y col., 2016). Sin embargo, siete días después de la aplicación del ECR, tanto en el grupo control como en el grupo estrés, hay una disminución de estas oscilaciones de 6 a 10 Hz en los periodos de baja velocidad respecto a los periodos de alta velocidad. Especulamos que puede haber un proceso de familiarización que pudiese estar cambiando las dinámicas de estas oscilaciones (Jacinto y col., 2013). Finalmente, es poco probable que las oscilaciones theta en el rango de 6 a 10 Hz observadas en esta tesis durante los periodos de movilidad, tanto en la caja de condicionamiento como en la prueba de campo abierto, estén relacionadas con las oscilaciones theta evocadas en el freezing gatillado por el EC+ (Courtin y col., 2014b). En apoyo a esta idea, cuando se inhibe el septum medial (una región que es propuesta como la generadora de las oscilaciones theta en el HPCd y que son moduladas por la velocidad de desplazamiento) con muscimol, las oscilaciones theta de la CPFdm siguen mostrando el reseteo de fase al comienzo de la entrega del EC+ (Courtin y col., 2014b; Karalis y col., 2016).

6. Modelo propuesto del efecto del ECR sobre las dinámicas del circuito del miedo

Finalmente, en esta tesis se propone un modelo mecanístico por el cual el ECR podría actuar a nivel de la CPFdm y de sus conexiones con la ABL y el HPCv para promover la generalización de la memoria miedo en las ratas estresadas, a través de la disminución de las oscilaciones de 1 a 4 Hz. En primer lugar, la ABL se hipertrofia bajo protocolos de ECR (Vyas y col., 2002), lo cual es acompañado de un aumento de la excitabilidad de esta estructura (Rosenkranz y col., 2010). Esto gatillaría un incremento de la excitabilidad de las neuronas piramidales de la capa II y III de la CPFdm, produciendo un mayor sesgo de estas a activarse en presencia de contextos no asociados al EC. Estos engramas generados serían estabilizados en el tiempo y competirían con la formación de nuevos engramas que señalen

seguridad, como el reconocimiento de contextos asociados a la extinción de una memoria de miedo (Negrón-Oyarzo y col., 2016). Además, las eferencias de las neuronas piramidales localizadas en la ABL sinaptan con las neuronas PV+ en la CPFdm. Esta conectividad neuronal podría ser activada a la frecuencia de 1 a 4 Hz durante la evocación de miedo, produciendo el comportamiento de freezing sostenido. Este patrón oscilatorio tendría una menor potencia en la CPFdm debido a la atrofia de las neuronas piramidales en esta área del cerebro. Cabe destacar que las neuronas GABAérgicas PV+ activadas desde el HPCv y desde la ABL (Gabbott y col., 2002; Gabbott y col., 2006), serían parte de distintos engramas formados dentro la CPFdm (Dejean y col., 2016). Como consecuencia, este aumento de la excitabilidad de la ABL podría incrementar el número de sus proyecciones a la AC, que a través de sus conexiones con la SGPA aumentaría el comportamiento de freezing (LeDoux, 2000; Tovote y col., 2016).

En segundo lugar, se sabe que existe una direccionalidad en las oscilaciones de 4 Hz, apareciendo primero en la CPFdm y luego en la ABL (Karalis y col., 2016). En las ratas estresadas de esta tesis es posible que las proyecciones de la CPFdm hacia la ABL hipertrofiada generen un aumento de la excitabilidad en esta área, y, por consiguiente, un aumento de potencia de 1 a 4 Hz en la ABL, lo cual sería el patrón contrario al observado en la CPFdm. Esto podría provocar cambios en la sincronización y/o direccionalidad, tanto de las oscilaciones de 1 a 4 Hz, como de las oscilaciones de tipo theta y gamma observadas en estas estructuras durante la evocación del miedo condicionado (Bocchio y col., 2017).

En tercer lugar, la atrofia del HPCv (Christian y col., 2011) podría causar una pérdida de su capacidad para discriminar el contexto como una señal segura. La atrofia del HPCv causaría una disminución del número de las proyecciones excitatorias del HPCv que sinaptan con las neuronas PV+ de la CPFdm. Las neuronas PV+ no se ven afectadas por protocolos de estrés crónico (Page & Coutellier, 2019), y su inhibición genera el comportamiento de freezing (Courtin y col., 2014b), lo que promovería la generalización del miedo.

En cuarto lugar, como la CPFdm no tiene conexiones directas al HPCv, las conexiones indirectas a través del núcleo reuniens del tálamo podrían ser importantes para la

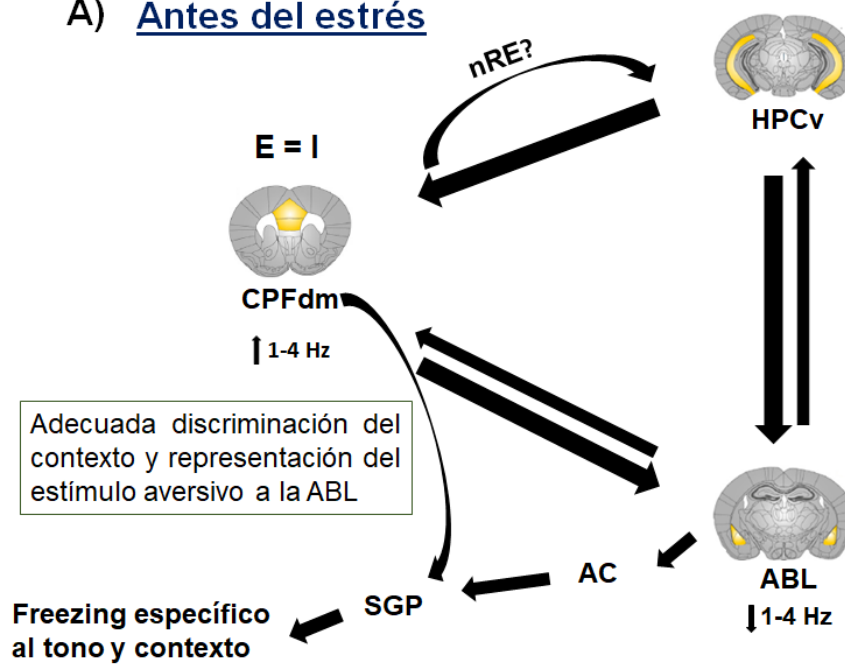
sincronización de estas oscilaciones de 1 a 4 Hz (Roy y col., 2017). Es necesario nuevos estudios para dilucidar si esta vía tiene un significado funcional en el circuito del miedo.

En quinto y último lugar, el HPCv y la ABL tienen conexiones recíprocas. Por ejemplo, se sabe que cuando los ratones están en freezing durante la evocación del miedo contextual, se activan proyecciones desde el HPCv hacia la ABL (Kim & Cho, 2017), por lo que en nuestro protocolo de ECR podría haber una disminución de las proyecciones excitatorias e inhibitorias, que pudiesen afectar la llegada de información del contexto a la ABL. Mientras que un aumento del número de las proyecciones desde la ABL al HPCv podrían aportar en el componente ansioso observado en las ratas estresadas (Felix-Ortiz y col., 2013).

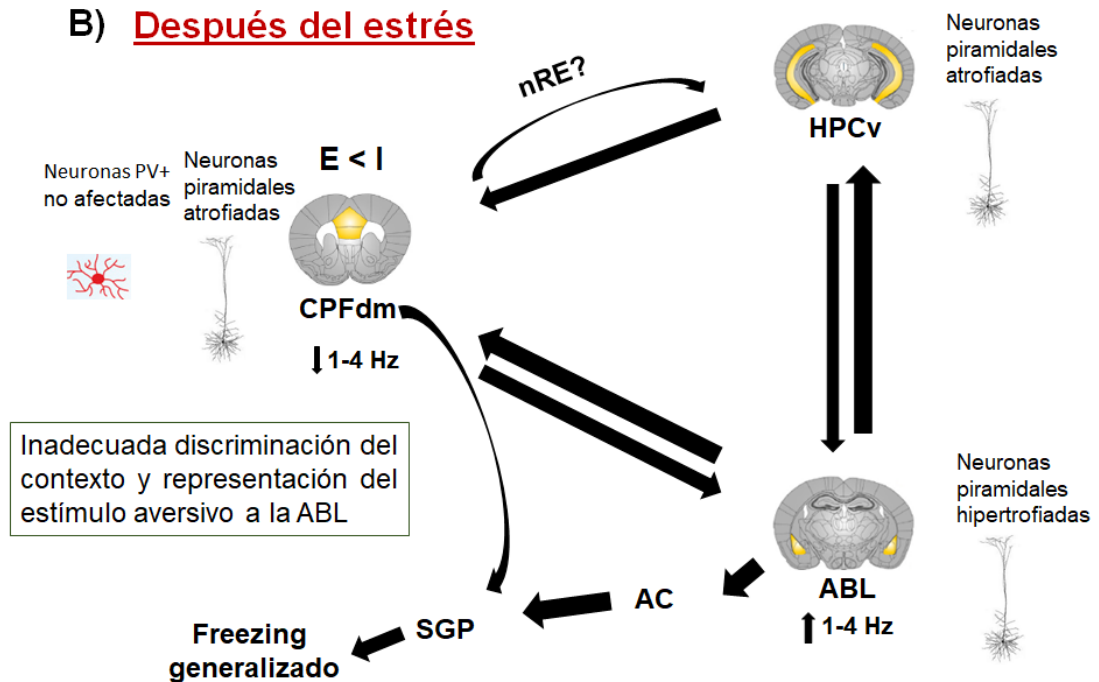
Todos los puntos citados anteriormente indican un aumento de la inhibición por sobre la excitación en la CPFdm de las ratas estresadas, lo que estaría en concordancia con lo observado en los pacientes que sufren de trastornos del comportamiento como el TEPT, quienes muestran una generalización en la evocación de la memoria de miedo (Pitman y col., 2012; Maren y Holmes, 2016; McKlveen y col., 2019; Page & Coutellier, 2019).

Los resultados de esta tesis arrojan las primeras directrices para futuras investigaciones en esta área. Nuevos estudios deberán buscar establecer si el estrés crónico es capaz de cambiar la direccionalidad de la CPFdm a la ABL de estas oscilaciones de baja frecuencia durante la evocación del miedo condicionado, y si estas aún son capaces de predecir este comportamiento. También, será importante investigar si es posible revertir la generalización del miedo aumentado artificialmente la potencia de estas oscilaciones de baja frecuencia en la CPFdm. Todas estas investigaciones ayudarán a complementar las terapias de extinción de las memorias aversivas asociada a los trastornos de tipo ansioso.

A) Antes del estrés



B) Después del estrés



Esquema 2. Mecanismo propuesto por el cual el ECR podría afectar el circuito del miedo a nivel del equilibrio excitación-inhibición y/o a través de la sincronización de las oscilaciones de 1 a 4 Hz durante el freezing. En "A" la situación antes del estrés y en "B" la situación después del estrés. Las líneas gruesas indican un aumento de las proyecciones excitatorias, mientras que las líneas delgadas indican una disminución de las proyecciones excitatorias. E: excitación, I: inhibición, ABL: amígdala basolateral, AC: amígdala central, CPFdm: corteza prefrontal dorsomedial, HPCv: hipocampo ventral, SGPA: sustancia gris periacueductal, nRE: núcleo reuniens del tálamo.

VI. CONCLUSIÓN

Esta es la primera vez que se describe en ratas un aumento de la potencia espectral en una banda de frecuencia entre 1 a 4 Hz en la CPFdm, lo cual se correlaciona con la expresión y evocación de la memoria de miedo. También, es la primera vez que se evaluó el efecto del estrés crónico sobre la dinámica de estas oscilaciones cerebrales *in vivo* en animales que previamente han adquirido y consolidado la memoria de miedo. Específicamente, estas oscilaciones aparecieron en el comportamiento de freezing durante la adquisición y la evocación del miedo en el paradigma del miedo condicionado y no se correlacionaron con eventos de movilidad e inmovilidad en la fase de habituación como tampoco con eventos de movilidad durante las etapas de evocación de la memoria de miedo, tanto el contexto original en el que condicionamiento al tono se llevo a cabo, como en un contexto no asociado al condicionamiento. Además, estas oscilaciones de 1 a 4 Hz no fueron moduladas por la velocidad de desplazamiento en la prueba del campo abierto. El descubrimiento más relevante encontrado en esta tesis fue que el estrés crónico disminuyó la potencia espectral de las oscilaciones de 1 a 4 Hz durante el tono en la CPFdm. Esta alteración en la dinámica cerebral no generó cambios en la expresión de la memoria de miedo durante el tono respecto al grupo control, sin embargo, se observó una generalización contextual y una falta de discriminación al tono como el gatillador de la respuesta de freezing.

Los resultados de esta tesis sugieren que los cambios morfológicos y fisiológicos que produce el estrés crónico sobre el circuito del miedo puede alterar la dinámica de las oscilaciones de 1 a 4 Hz en la CPFdm y el comportamiento de freezing, lo que se traduce en una pobre discriminación contextual y problemas en la representación del tono como una señal aversiva, llevando a una generalización del miedo, el cual es un fenotipo observado en personas con TEPT, por lo que la modulación de estas oscilaciones podría ser utilizada como un complemento de los tratamientos de extinción de las memorias de miedo en este tipo de trastornos ansiosos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Association, A. P. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®)*. American Psychiatric Pub.

Baldi, E., Lorenzini, C. A., & Bucherelli, C. (2004). Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, *81*(3), 162-166.

Biskamp, J., Bartos, M., & Sauer, J.-F. (2017). Organization of prefrontal network activity by respiration-related oscillations. *Scientific Reports*, *7*, 45508.

Blanchard, R. J., Yudko, E. B., Rodgers, R. J., & Blanchard, D. C. (1993). Defense system psychopharmacology: An ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behavioural Brain Research*, *58*(1-2), 155-165.

Blanchard, Robert J., Fukunaga, K. K., & Blanchard, D. C. (1976). Environmental control of defensive reactions to footshock. *Bulletin of the Psychonomic Society*, *8*(2), 129-130.

Blechert, J., Michael, T., Vriends, N., Margraf, J., & Wilhelm, F. H. (2007). Fear conditioning in posttraumatic stress disorder: Evidence for delayed extinction of autonomic, experiential, and behavioural responses. *Behaviour Research and Therapy*, *45*(9), 2019-2033.

Blum, S., Hebert, A. E., & Dash, P. K. (2006). A role for the prefrontal cortex in recall of recent and remote memories. *Neuroreport*, *17*(3), 341-344.

Bocchio, M., Nabavi, S., & Capogna, M. (2017). Synaptic Plasticity, Engrams, and Network Oscillations in Amygdala Circuits for Storage and Retrieval of Emotional Memories. *Neuron*, *94*(4), 731-743.

Bonnefond, M., Kastner, S., & Jensen, O. (2017). Communication between Brain Areas Based on Nested Oscillations. *ENeuro*, *4*(2).

Brown, S. M., Henning, S., & Wellman, C. L. (2005). Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, *15*(11), 1714-1722.

Burgos-Robles, A., Vidal-Gonzalez, I., & Quirk, G. J. (2009). Sustained conditioned responses in prelimbic prefrontal neurons are correlated with fear expression and extinction failure. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(26), 8474-8482.

Buzsáki, G. (2002). Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron*, *33*(3), 325-340.

Buzsáki, G., Anastassiou, C. A., & Koch, C. (2012). The origin of extracellular fields and currents—EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature Reviews. Neuroscience*, *13*(6), 407-420.

Buzsáki, G., & Draguhn, A. (2004). Neuronal oscillations in cortical networks. *Science (New York, N.Y.)*, *304*(5679), 1926-1929.

Buzsáki, G., & Wang, X.-J. (2012). Mechanisms of gamma oscillations. *Annual Review of Neuroscience*, *35*, 203-225.

Carvajal, C. (2002). Trastorno por estrés postraumático: Aspectos clínicos. *Revistachilena de neuro-psiquiatría*, *40*, 20-34.

- Chattarji, S., Tomar, A., Suvrathan, A., Ghosh, S., & Rahman, M. M. (2015). Neighborhood matters: Divergent patterns of stress-induced plasticity across the brain. *Nature Neuroscience*, *18*(10), 1364-1375.
- Cheriyian, J., Kaushik, M. K., Ferreira, A. N., & Sheets, P. L. (2016). Specific Targeting of the Basolateral Amygdala to Projectionally Defined Pyramidal Neurons in Prelimbic and Infralimbic Cortex. *ENeuro*, *3*(2).
- Chiba, S., Numakawa, T., Ninomiya, M., Richards, M. C., Wakabayashi, C., & Kunugi, H. (2012). Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *39*(1), 112-119.
- Cho, J.-H., Deisseroth, K., & Bolshakov, V. Y. (2013). Synaptic encoding of fear extinction in mPFC-amygdala circuits. *Neuron*, *80*(6), 1491-1507.
- Christian, K. M., Miracle, A. D., Wellman, C. L., & Nakazawa, K. (2011). Chronic stress-induced hippocampal dendritic retraction requires CA3 NMDA receptors. *Neuroscience*, *174*, 26-36.
- Colgin, L. L. (2011). Oscillations and hippocampal-prefrontal synchrony. *Current Opinion in Neurobiology*, *21*(3), 467-474.
- Conrad, C. D., LeDoux, J. E., Magariños, A. M., & McEwen, B. S. (1999). Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behavioral Neuroscience*, *113*(5), 902-913.
- Cook, S. C., & Wellman, C. L. (2004). Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Journal of Neurobiology*, *60*(2), 236-248.
- Corcoran, K. A., & Quirk, G. J. (2007). Activity in Prelimbic Cortex Is Necessary for the Expression of Learned, But Not Innate, Fears. *The Journal of Neuroscience*, *27*(4), 840-844.
- Courtin, J., Karalis, N., Gonzalez-Campo, C., Wurtz, H., & Herry, C. (2014). Persistence of amygdala gamma oscillations during extinction learning predicts spontaneous fear recovery. *Neurobiology of Learning and Memory*, *113*, 82-89.
- Courtin, Julien, Chaudun, F., Rozeske, R. R., Karalis, N., Gonzalez-Campo, C., Wurtz, H., Abdi, A., Baufreton, J., Bienvenu, T. C. M., & Herry, C. (2014). Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. *Nature*, *505*(7481), 92-96.
- Davis, M., Walker, D. L., Miles, L., & Grillon, C. (2010). Phasic vs sustained fear in rats and humans: Role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *35*(1), 105-135.
- de Diego, A. M. G., Gandía, L., & García, A. G. (2008). A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, *192*(2), 287-301.
- de Kloet, C. S., Vermetten, E., Geuze, E., Kavelaars, A., Heijnen, C. J., & Westenberg, H. G. M. (2006). Assessment of HPA-axis function in posttraumatic stress disorder: Pharmacological and non-pharmacological challenge tests, a review. *Journal of Psychiatric Research*, *40*(6), 550-567.
- Dejean, C., Courtin, J., Karalis, N., Chaudun, F., Wurtz, H., Bienvenu, T. C. M., & Herry, C. (2016). Prefrontal neuronal assemblies temporally control fear behaviour. *Nature*, *535*(7612), 420-424.

Diorio, D., Viau, V., & Meaney, M. J. (1993). The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 13(9), 3839-3847.

Dr. Hans Selye M.D., D. Sc., Ph. D. (1975). Confusion and Controversy in the Stress Field. *Journal of Human Stress*, 1(2), 37-44.

Duval, E. R., Javanbakht, A., & Liberzon, I. (2015). Neural circuits in anxiety and stress disorders: A focused review. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 11, 115-126.

Einevoll, G. T., Kayser, C., Logothetis, N. K., & Panzeri, S. (2013). Modelling and analysis of local field potentials for studying the function of cortical circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(11), 770-785.

Felix-Ortiz, A. C., Beyeler, A., Seo, C., Leppla, C. A., Wildes, C. P., & Tye, K. M. (2013). BLA to vHPC Inputs Modulate Anxiety-Related Behaviors. *Neuron*, 79(4), 658-664.

Fujisawa, S., & Buzsáki, G. (2011). A 4 Hz oscillation adaptively synchronizes prefrontal, VTA, and hippocampal activities. *Neuron*, 72(1), 153-165.

Gabbott, P., Headlam, A., & Busby, S. (2002). Morphological evidence that CA1 hippocampal afferents monosynaptically innervate PV-containing neurons and NADPH-diaphorase reactive cells in the medial prefrontal cortex (Areas 25/32) of the rat. *Brain Research*, 946(2), 314-322.

Gabbott, P. L. A., Warner, T. A., & Busby, S. J. (2006). Amygdala input monosynaptically innervates parvalbumin immunoreactive local circuit neurons in rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, 139(3), 1039-1048.

Ghosh, S., & Chattarji, S. (2015). Neuronal encoding of the switch from specific to generalized fear. *Nature Neuroscience*, 18(1), 112-120.

Gilbert-Juan, J., Castillo-Gomez, E., Guirado, R., Moltó, M. D., & Nacher, J. (2013). Chronic stress alters inhibitory networks in the medial prefrontal cortex of adult mice. *Brain Structure & Function*, 218(6), 1591-1605.

Gilbert-Juan, J., Castillo-Gomez, E., Pérez-Rando, M., Moltó, M. D., & Nacher, J. (2011). Chronic stress induces changes in the structure of interneurons and in the expression of molecules related to neuronal structural plasticity and inhibitory neurotransmission in the amygdala of adult mice. *Experimental Neurology*, 232(1), 33-40.

Giustino, T. F., & Maren, S. (2015). The Role of the Medial Prefrontal Cortex in the Conditioning and Extinction of Fear. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 298.

Goldstein, D. S. (2010). Adrenal Responses to Stress. *Cellular and molecular neurobiology*, 30(8), 1433-1440.

Guérineau, N. C., & Desarménien, M. G. (2010). Developmental and stress-induced remodeling of cell-cell communication in the adrenal medullary tissue. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30(8), 1425-1431.

Hagenaars, M. A., Oitzl, M., & Roelofs, K. (2014). Updating freeze: Aligning animal and human research. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 47, 165-176.

Harris, R. B., Zhou, J., Youngblood, B. D., Rybkin, I. I., Smagin, G. N., & Ryan, D. H. (1998). Effect of repeated stress on body weight and body composition of rats fed low- and high-fat diets. *The American Journal of Physiology*, 275(6), R1928-1938.

Heidbreder, C. A., & Groenewegen, H. J. (2003). The medial prefrontal cortex in the rat:

Evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(6), 555-579.

Herman, J. P., McKlveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., Scheimann, J., & Myers, B. (2016). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Comprehensive Physiology*, 6(2), 603-621.

Herman, J. P., & Tasker, J. G. (2016). Paraventricular Hypothalamic Mechanisms of Chronic Stress Adaptation. *Frontiers in Endocrinology*, 7, 137.

Hinman, J. R., Penley, S. C., Long, L. L., Escabí, M. A., & Chrobak, J. J. (2011). Septotemporal variation in dynamics of theta: Speed and habituation. *Journal of Neurophysiology*, 105(6), 2675-2686.

Hoffman, A. N., Lorson, N. G., Sanabria, F., Foster Olive, M., & Conrad, C. D. (2014). Chronic stress disrupts fear extinction and enhances amygdala and hippocampal Fos expression in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Neurobiology of Learning and Memory*, 112, 139-147.

Jacinto, L. R., Cerqueira, J. J., & Sousa, N. (2016). Patterns of Theta Activity in Limbic Anxiety Circuit Preceding Exploratory Behavior in Approach-Avoidance Conflict. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10, 171.

Jacinto, L. R., Reis, J. S., Dias, N. S., Cerqueira, J. J., Correia, J. H., & Sousa, N. (2013). Stress affects theta activity in limbic networks and impairs novelty-induced exploration and familiarization. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7, 127.

Jackson, M. (2014). Evaluating the Role of Hans Selye in the Modern History of Stress. En D. Cantor & E. Ramsden (Eds.), *Stress, Shock, and Adaptation in the Twentieth Century*. University of Rochester Press.

Jeong, J. Y., Lee, D. H., & Kang, S. S. (2013). Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice. *Endocrinology and Metabolism (Seoul, Korea)*, 28(4), 288-296.

Jouvet, M. (1969). Biogenic Amines and the States of Sleep. *Science*, 163(3862), 32-41.

Kanta, V., Pare, D., & Headley, D. B. (2019). Closed-loop control of gamma oscillations in the amygdala demonstrates their role in spatial memory consolidation. *Nature Communications*, 10(1), 3970.

Karalis, N., Dejean, C., Chaudun, F., Khoder, S., Rozeske, R. R., Wurtz, H., Bagur, S., Benchenane, K., Sirota, A., Courtin, J., & Herry, C. (2016). 4-Hz oscillations synchronize prefrontal-amygdala circuits during fear behavior. *Nature Neuroscience*, 19(4), 605-612.

Kessler, R. C., Chiu, W. T., Demler, O., & Walters, E. E. (2005). Prevalence, Severity, and Comorbidity of Twelve-month DSM-IV Disorders in the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *Archives of general psychiatry*, 62(6), 617-627.

Kim, W. B., & Cho, J.-H. (2017). Synaptic Targeting of Double-Projecting Ventral CA1 Hippocampal Neurons to the Medial Prefrontal Cortex and Basal Amygdala. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 37(19), 4868-4882.

Klucken, T., Kruse, O., Schweckendiek, J., Kuepper, Y., Mueller, E. M., Hennig, J., & Stark, R. (2016). No evidence for blocking the return of fear by disrupting reconsolidation prior to extinction learning. *Cortex; a Journal Devoted to the Study of the Nervous System and Behavior*, 79, 112-122.

Knapska, E., & Maren, S. (2009). Reciprocal patterns of c-Fos expression in the medial

prefrontal cortex and amygdala after extinction and renewal of conditioned fear. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 16(8), 486-493.

Koba, S., Inoue, R., & Watanabe, T. (2016). Role played by periaqueductal gray neurons in parasympathetically mediated fear bradycardia in conscious rats. *Physiological Reports*, 4(12).

Kupriianov, R. V., & Zhdanov, R. I. (2014). [Stress and allostasis: Problems, outlooks and relationships]. *Zhurnal Vysshei Nervnoi Deiatelnosti Imeni I P Pavlova*, 64(1), 21-31.

Laurent, V., & Westbrook, R. F. (2009). Inactivation of the infralimbic but not the prelimbic cortex impairs consolidation and retrieval of fear extinction. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 16(9), 520-529.

LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 155-184.

LeDoux, J. E., Iwata, J., Cicchetti, P., & Reis, D. J. (1988). Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 8(7), 2517-2529.

Lesting, J., Daldrup, T., Narayanan, V., Himpe, C., Seidenbecher, T., & Pape, H.-C. (2013). Directional theta coherence in prefrontal cortical to amygdalo-hippocampal pathways signals fear extinction. *PLoS One*, 8(10), e77707.

Lesting, J., Narayanan, R. T., Kluge, C., Sangha, S., Seidenbecher, T., & Pape, H.-C. (2011). Patterns of coupled theta activity in amygdala-hippocampal-prefrontal cortical circuits during fear extinction. *PLoS One*, 6(6), e21714.

Likhtik, E., Stujenske, J. M., Topiwala, M. A., Harris, A. Z., & Gordon, J. A. (2014). Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. *Nature Neuroscience*, 17(1), 106-113.

Lisman, J. E., & Jensen, O. (2013). The θ - γ neural code. *Neuron*, 77(6), 1002-1016.

Little, J. P., & Carter, A. G. (2013). Synaptic mechanisms underlying strong reciprocal connectivity between the medial prefrontal cortex and basolateral amygdala. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(39), 15333-15342.

Liu, R.-J., & Aghajanian, G. K. (2008). Stress blunts serotonin- and hypocretin-evoked EPSCs in prefrontal cortex: Role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(1), 359-364.

Maingret, N., Girardeau, G., Todorova, R., Goutierre, M., & Zugaro, M. (2016). Hippocampo-cortical coupling mediates memory consolidation during sleep. *Nature Neuroscience*, 19(7), 959-964.

Maren, S., & Holmes, A. (2016). Stress and Fear Extinction. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 41(1), 58-79.

Marks, W. N., Fenton, E. Y., Guskjolen, A. J., & Kalynchuk, L. E. (2015). The effect of chronic corticosterone on fear learning and memory depends on dose and the testing protocol. *Neuroscience*, 289, 324-333.

Maroun, M. (2013). Medial prefrontal cortex: Multiple roles in fear and extinction. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 19(4), 370-383.

- Martí, O., Martí, J., & Armario, A. (1994). Effects of chronic stress on food intake in rats: Influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiology & Behavior*, *55*(4), 747-753.
- Mazzoni, A., Logothetis, N. K., & Panzeri, S. (2012). The information content of Local Field Potentials: Experiments and models. *arXiv:1206.0560 [q-bio]*.
- McEwen, B. S., & Seeman, T. (1999). Protective and damaging effects of mediators of stress. Elaborating and testing the concepts of allostasis and allostatic load. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *896*, 30-47.
- McEwen, Bruce S., & Akil, H. (2020). Revisiting the Stress Concept: Implications for Affective Disorders. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *40*(1), 12-21.
- McEwen, Bruce S., Bowles, N. P., Gray, J. D., Hill, M. N., Hunter, R. G., Karatsoreos, I. N., & Nasca, C. (2015). Mechanisms of stress in the brain. *Nature Neuroscience*, *18*(10), 1353-1363.
- McFarland, W. L., Teitelbaum, H., & Hedges, E. K. (1975). Relationship between hippocampal theta activity and running speed in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *88*(1), 324-328.
- McKlveen, J. M., Myers, B., & Herman, J. P. (2015). The medial prefrontal cortex: Coordinator of autonomic, neuroendocrine and behavioural responses to stress. *Journal of Neuroendocrinology*, *27*(6), 446-456.
- McKlveen, Jessica M., Moloney, R. D., Scheimann, J. R., Myers, B., & Herman, J. P. (2019). «Braking» the Prefrontal Cortex: The Role of Glucocorticoids and Interneurons in Stress Adaptation and Pathology. *Biological Psychiatry*, *86*(9), 669-681.
- Milad, M. R., & Quirk, G. J. (2012). Fear Extinction as a Model for Translational Neuroscience: Ten Years of Progress. *Annual Review of Psychology*, *63*(1), 129-151.
- Miracle, A. D., Brace, M. F., Huyck, K. D., Singler, S. A., & Wellman, C. L. (2006). Chronic stress impairs recall of extinction of conditioned fear. *Neurobiology of Learning and Memory*, *85*(3), 213-218.
- Mizoguchi, K., Ishige, A., Aburada, M., & Tabira, T. (2003). Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: Involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*, *119*(3), 887-897.
- Moberly, A. H., Schreck, M., Bhattarai, J. P., Zweifel, L. S., Luo, W., & Ma, M. (2018). Olfactory inputs modulate respiration-related rhythmic activity in the prefrontal cortex and freezing behavior. *Nature Communications*, *9*(1), 1528.
- Morgan, M. A., & LeDoux, J. E. (1995). Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. *Behavioral Neuroscience*, *109*(4), 681-688.
- Myers, B., Scheimann, J. R., Franco-Villanueva, A., & Herman, J. P. (2017). Ascending mechanisms of stress integration: Implications for brainstem regulation of neuroendocrine and behavioral stress responses. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *74*(Pt B), 366-375.
- Negrón-Oyarzo, I., Aboitiz, F., & Fuentealba, P. (2016). Impaired Functional Connectivity in the Prefrontal Cortex: A Mechanism for Chronic Stress-Induced Neuropsychiatric Disorders. *Neural Plasticity*, *2016*, 7539065.

Negrón-Oyarzo, I., Pérez, M. Á., Terreros, G., Muñoz, P., & Dagnino-Subiabre, A. (2014). Effects of chronic stress in adolescence on learned fear, anxiety, and synaptic transmission in the rat prelimbic cortex. *Behavioural Brain Research*, 259, 342-353.

O'Neill, P.-K., Gordon, J. A., & Sigurdsson, T. (2013). Theta oscillations in the medial prefrontal cortex are modulated by spatial working memory and synchronize with the hippocampus through its ventral subregion. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(35), 14211-14224.

Orr, S. P., Metzger, L. J., Lasko, N. B., Macklin, M. L., Peri, T., & Pitman, R. K. (2000). De novo conditioning in trauma-exposed individuals with and without posttraumatic stress disorder. *Journal of Abnormal Psychology*, 109(2), 290-298.

Ozamiz-Etxebarria, N., Dosil-Santamaria, M., Picaza-Gorrochategui, M., & Idoiaga-Mondragon, N. (2020). Niveles de estrés, ansiedad y depresión en la primera fase del brote del COVID-19 en una muestra recogida en el norte de España. *Cadernos de Saúde Pública*, 36(4), e00054020.

Page, C. E., & Coutellier, L. (2019). Prefrontal excitatory/inhibitory balance in stress and emotional disorders: Evidence for over-inhibition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 105, 39-51.

Paxinos G., Watson C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th Edition.

Pérez Benítez, C. I., Vicente, B., Zlotnick, C., Kohn, R., Johnson, J., Valdivia, S., & Rioseco, P. (2009). Estudio epidemiológico de sucesos traumáticos, trastorno de estrés post-traumático y otros trastornos psiquiátricos en una muestra representativa de Chile. *Salud mental (Mexico City, Mexico)*, 32(2), 145-153.

Pérez-Cano, H. J., Moreno-Murguía, M. B., Morales-López, O., Crow-Buchanan, O., English, J. A., Lozano-Alcázar, J., & Somilleda-Ventura, S. A. (2020). Ansiedad, depresión y estrés como respuesta a la pandemia de COVID-19. *Cirugía y Cirujanos*, 88(5), 4511.

Pitman, R. K., Rasmusson, A. M., Koenen, K. C., Shin, L. M., Orr, S. P., Gilbertson, M. W., Milad, M. R., & Liberzon, I. (2012). Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nature Reviews. Neuroscience*, 13(11), 769-787.

Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B. S., & Sanacora, G. (2011). The stressed synapse: The impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nature Reviews. Neuroscience*, 13(1), 22-37.

Prieto, G. A., Parker, R. L., Thomson, D. J., Vernon, F. L., & Graham, R. L. (2007). Reducing the bias of multitaper spectrum estimates. *Geophysical Journal International*, 171(3), 1269-1281.

Pritchett, D. L., Siegle, J. H., Deister, C. A., & Moore, C. I. (2015). For things needing your attention: The role of neocortical gamma in sensory perception. *Current Opinion in Neurobiology*, 31, 254-263.

Quirk, G. J., & Mueller, D. (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(1), 56-72.

Rabasa, C., & Dickson, S. L. (2016). Impact of stress on metabolism and energy balance. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 9, 71-77.

Radley, J. J., Sisti, H. M., Hao, J., Rocher, A. B., McCall, T., Hof, P. R., McEwen, B. S., & Morrison, J. H. (2004). Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in

pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, 125(1), 1-6.

Radley, Jason J., Rocher, A. B., Janssen, W. G. M., Hof, P. R., McEwen, B. S., & Morrison, J. H. (2005). Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repeated stress. *Experimental Neurology*, 196(1), 199-203.

Radley, Jason J., Rocher, A. B., Miller, M., Janssen, W. G. M., Liston, C., Hof, P. R., McEwen, B. S., & Morrison, J. H. (2006). Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 16(3), 313-320.

Riga, D., Matos, M. R., Glas, A., Smit, A. B., Spijker, S., & Van den Oever, M. C. (2014). Optogenetic dissection of medial prefrontal cortex circuitry. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8, 230.

Rojas-Líbano, D., Wimmer Del Solar, J., Aguilar-Rivera, M., Montefusco-Siegmund, R., & Maldonado, P. E. (2018). Local cortical activity of distant brain areas can phase-lock to the olfactory bulb's respiratory rhythm in the freely behaving rat. *Journal of Neurophysiology*, 120(3), 960-972.

Rom, O., & Reznick, A. Z. (2016). The Stress Reaction: A Historical Perspective. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 905, 1-4.

Rosenkranz, J. A., Venheim, E. R., & Padival, M. (2010). Chronic stress causes amygdala hyperexcitability in rodents. *Biological Psychiatry*, 67(12), 1128-1136.

Roy, A., Svensson, F. P., Mazeh, A., & Kocsis, B. (2017). Prefrontal-hippocampal coupling by theta rhythm and by 2-5 Hz oscillation in the delta band: The role of the nucleus reuniens of the thalamus. *Brain Structure & Function*, 222(6), 2819-2830.

Sadaghiani, S., & Kleinschmidt, A. (2016). Brain Networks and α -Oscillations: Structural and Functional Foundations of Cognitive Control. *Trends in Cognitive Sciences*, 20(11), 805-817.

Salgado-Roa, J. A., & Leria-Dulčić, F. J. (2019). Burnout, satisfacción y calidad de vida laboral en funcionarios de la salud pública chilenos. *Universidad y Salud*, 22(1), 06-16.

Seidenbecher, T., Laxmi, T. R., Stork, O., & Pape, H.-C. (2003). Amygdalar and Hippocampal Theta Rhythm Synchronization During Fear Memory Retrieval. *Science*, 301(5634), 846-850.

Selye, H. (1946). The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 6, 117-230.

Selye, Hans. (1936). A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature*, 138(3479), 32-32.

Selye, Hans. (1950). Stress and the General Adaptation Syndrome. *British Medical Journal*, 1(4667), 1383-1392.

Shansky, R. M., Hamo, C., Hof, P. R., McEwen, B. S., & Morrison, J. H. (2009). Stress-Induced Dendritic Remodeling in the Prefrontal Cortex is Circuit Specific. *Cerebral Cortex (New York, NY)*, 19(10), 2479-2484.

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: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 36(2), 529-538.

Sotocinal, S. G., Sorge, R. E., Zaloum, A., Tuttle, A. H., Martin, L. J., Wieskopf, J. S., Mapplebeck, J. C., Wei, P., Zhan, S., Zhang, S., McDougall, J. J., King, O. D., & Mogil, J. S.

(2011). The Rat Grimace Scale: A partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular Pain*, 7, 55.

Sotres-Bayon, F., Sierra-Mercado, D., Pardilla-Delgado, E., & Quirk, G. J. (2012). Gating of fear in prelimbic cortex by hippocampal and amygdala inputs. *Neuron*, 76(4), 804-812.

Stern, C. A. J., Gazarini, L., Vanvossen, A. C., Hames, M. S., & Bertoglio, L. J. (2014). Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 21(1), 14-20.

Stujenske, J. M., Likhtik, E., Topiwala, M. A., & Gordon, J. A. (2014). Fear and safety engage competing patterns of theta-gamma coupling in the basolateral amygdala. *Neuron*, 83(4), 919-933.

Tafet, G. E., & Bernardini, R. (2003). Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 27(6), 893-903.

The Principles of Humane Experimental Technique. (1960). *Medical Journal of Australia*, 1(13), 500-500.

Tovote, P., Esposito, M. S., Botta, P., Chaudun, F., Fadok, J. P., Markovic, M., Wolff, S. B. E., Ramakrishnan, C., Fenno, L., Deisseroth, K., Herry, C., Arber, S., & Lüthi, A. (2016). Midbrain circuits for defensive behaviour. *Nature*, 534(7606), 206-212.

Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(6), 397-409.

Urcelay, G. P., & Miller, R. R. (2014). The functions of contexts in associative learning. *Behavioural Processes*, 104, 2-12.

Valentino, R. J., Foote, S. L., & Page, M. E. (1993). The locus coeruleus as a site for integrating corticotropin-releasing factor and noradrenergic mediation of stress responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 697, 173-188.

van Aerde, K. I., & Feldmeyer, D. (2015). Morphological and physiological characterization of pyramidal neuron subtypes in rat medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 25(3), 788-805.

Vanderwolf, C. H. (1969). Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 26(4), 407-418.

Varela, F., Lachaux, J. P., Rodriguez, E., & Martinerie, J. (2001). The brainweb: Phase synchronization and large-scale integration. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(4), 229-239.

Vertes, R. P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse (New York, N.Y.)*, 51(1), 32-58.

Vicente, B., Saldívia, S., & Pihán, R. (2016). Prevalencias y brechas hoy: Salud mental mañana. *Acta bioethica*, 22(1), 51-61.

Vidal-Gonzalez, I., Vidal-Gonzalez, B., Rauch, S. L., & Quirk, G. J. (2006). Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 13(6), 728-733.

Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana Rao, B. S., & Chattarji, S. (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(15),

6810-6818.

Wallace, D. M., Magnuson, D. J., & Gray, T. S. (1989). The amygdalo-brainstem pathway: Selective innervation of dopaminergic, noradrenergic and adrenergic cells in the rat. *Neuroscience Letters*, *97*(3), 252-258.

Wellman, C. L. (2001). Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *Journal of Neurobiology*, *49*(3), 245-253.

Whitmore, N. W., & Lin, S.-C. (2016). Unmasking local activity within local field potentials (LFPs) by removing distal electrical signals using independent component analysis. *NeuroImage*, *132*, 79-92.

Wilber, A. A., Walker, A. G., Southwood, C. J., Farrell, M. R., Lin, G. L., Rebec, G. V., & Wellman, C. L. (2011). Chronic stress alters neural activity in medial prefrontal cortex during retrieval of extinction. *Neuroscience*, *174*, 115-131.

ANEXOS

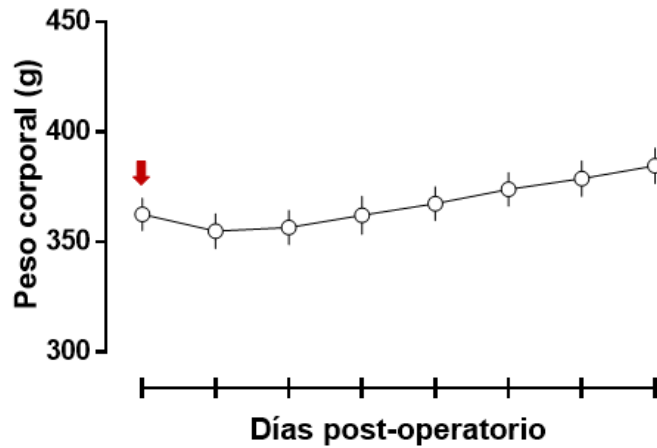


Figura 1. Evaluación del peso después del implante de los AMEs en la CPFdm. La flecha roja indica el día de la operación. Se puede observar como las ratas aumentan de peso durante los 7 días de post operatorio.

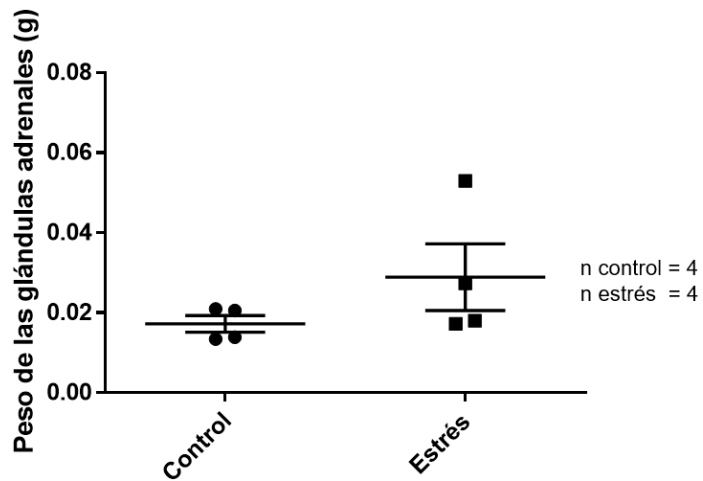


Figura 2. Diferencia en el peso de las glándulas adrenales entre el grupo control y estrés. Se puede observar una tendencia a un aumento de peso de las glándulas adrenales en el grupo estrés. $p=0,343$

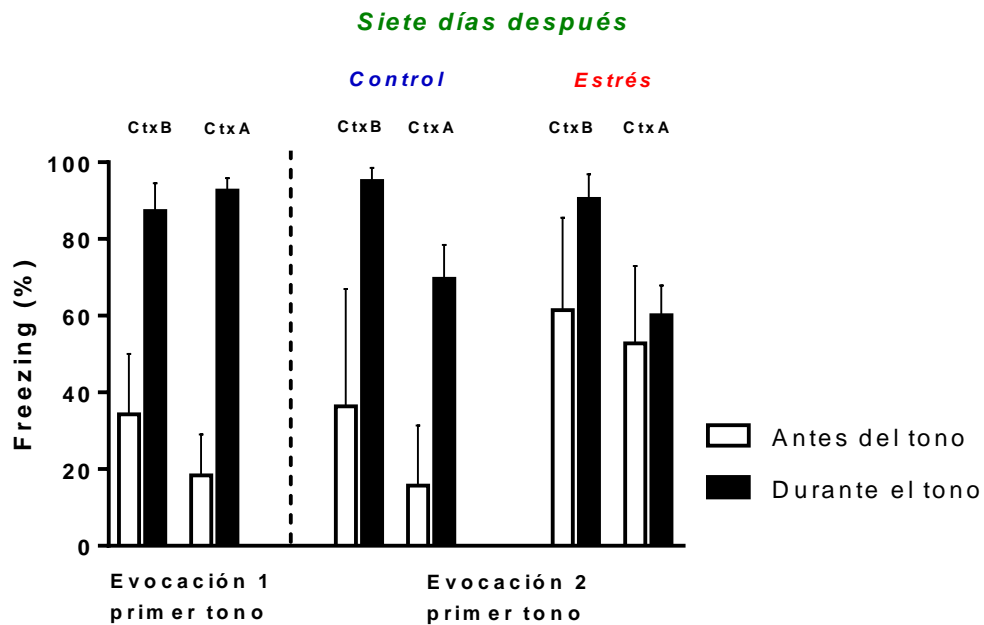


Figura 3. Diferencia en el porcentaje de freezing durante la transición al primer tono en el contexto B y en el contexto A. Porcentaje de freezing 1 día después del condicionamiento al miedo (izquierda), 7 días después en el grupo control (medio) y 7 días después del ECR en el grupo estrés (derecha) durante los 30 s previos (barra blanca) y los 30 s posteriores (barra negra) al inicio del primer tono en el contexto B y el contexto A. CtxB 1 día después del condicionamiento al miedo (n=6): $t= 3,92$; $df= 5$ $p= 0,011$. CtxA 1 día después del condicionamiento al miedo (n=6): $t= 7,02$; $df= 5$; $p< 0,001$. CtxB en grupo control (n=3): $t= 2,09$; $df= 2$; $p= 0,172$. CtxA grupo control (n=3): $t= 2,47$; $df=2$; $p= 0,132$. CtxB grupo estrés (n=4): $t= 1,38$; $df= 3$; $p= 0,261$. CtxA grupo estrés (n=4): $t= 0,282$; $df= 3$; $p= 0,796$

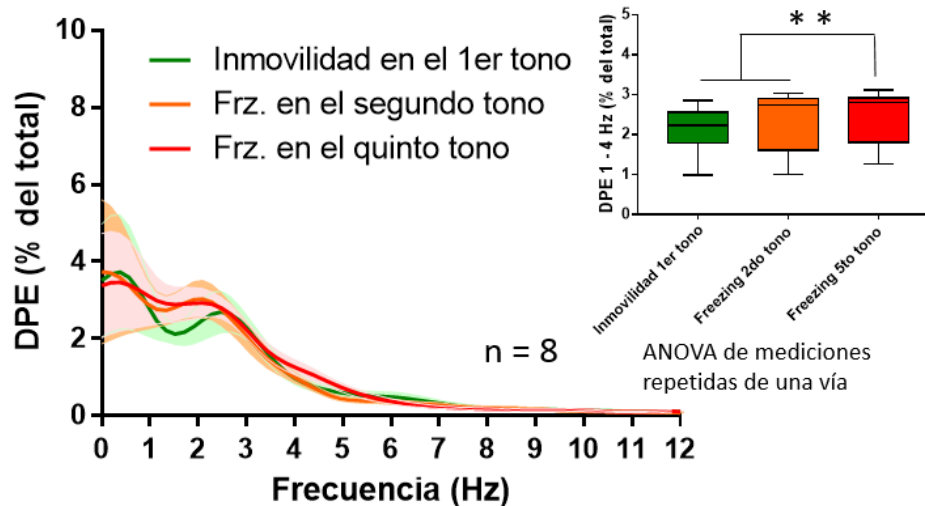


Figura 4. DPE durante la etapa de adquisición del miedo condicionado. DPE de las oscilaciones de 1 a 4 Hz durante la inmovilidad en el primer tono de la habituación y durante el freezing en el primer y quinto tono de la adquisición del miedo condicionado, con su respectiva cuantificación (recuadro). Existe una diferencia en la DPE de las oscilaciones de 1 a 4 Hz durante los distintos comportamientos: $F(1,15, 18,4)= 10,4$; $p(**)= 0,004$. El post test de Tukey arrojó las siguientes diferencias: Inmovilidad en el primer tono de la habituación vs

freezing en el segundo tono del condicionamiento al miedo: $q= 2,99$; $df= 16$; $p= 0,118.$, inmovilidad en el primer tono de la habituación vs freezing en el quinto tono del condicionamiento al miedo: $q= 6,01$; $df= 16$; $p= 0,002.$, freezing en el segundo tono del condicionamiento al miedo vs freezing en el quinto tono del condicionamiento al miedo: $q= 5,72$; $df= 16$; $p= 0,003$

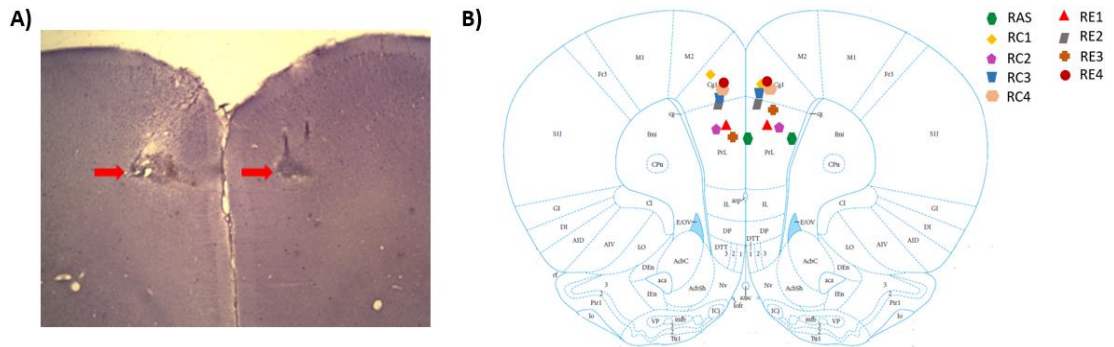


Figura 5. Posicionamiento final de los AMEs. Tinción de Nissl representativa mostrando la ubicación de los AMEs en la CPFdm (A). Mapa de la ubicación de los AMEs implantados en todas las ratas (B). Las flechas rojas indican la ubicación de los AMEs.