

CONDICIONAMIENTO
DE **MIEDO**
AL **CONTEXTO**

IMPLICACIONES PARA EL ESTUDIO
DE **MODELOS ANIMALES**
DE **ESTRÉS POSTRAUMÁTICO**

NÚRIA DAVIU ABANT

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS
UNIDAD de FISIOLÓGIA ANIMAL
Dept. Biología Celular, Fisiología e Inmunología
Facultad de Biociencias
UNIVERSITAT AUTÒNOMA de BARCELONA



TESIS DOCTORAL
2013

DIRECTORES DE TESIS

ANTONIO ARMARIO GARCÍA

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS
UNIDAD de FISIOLÓGIA ANIMAL
Dept. Biología Celular, Fisiología e Inmunología
Facultad de Biociencias
UNIVERSITAT AUTÒNOMA de BARCELONA

ROSER NADAL I ALEMANY

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS
UNIDAD de PSICOBIOLOGÍA
Dept. Psicología y Metodología
de las Ciencias de la Salud
Facultad de Psicología
UNIVERSITAT AUTÒNOMA de BARCELONA

La realización de la presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a las siguientes becas y ayudas:

- Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-01175)
- Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2011-28313)
- Instituto de Salud Carlos III (RD06/0001/0015, Redes Temáticas de Investigación
Cooperativa en Salud, Ministerio de Sanidad y Consumo)
- Instituto de Salud Carlos III (RD12/008/0014), Redes Temáticas de Investigación
Cooperativa en Salud, Ministerio de Sanidad y Consumo)
- Plan Nacional sobre Drogas
- Generalitat de Catalunya (SGR2009-16)

Durante el desarrollo de este trabajo, Núria Daviu Abant disfrutó de una beca de formación de profesorado universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia (AP-2007-02841).

ABREVIATURAS

ACTH: hormona adenocorticotropa
Arc: Núcleo arqueado del hipotálamo
ASR: Respuesta de sobresalto acústico
AVP: Arginina-vasopresina
BA: Núcleo basal de la amígdala
BL: Núcleo basolateral de la amígdala
BLA: Complejo Basolateral de la amígdala
BM: Núcleo basomedial de la amígdala
BNST: Núcleo del lecho de la estría terminal
CeA: Amígdala central
CER: Respuesta emocional condicionada
COF: Campo abierto circular
CPA: Condicionamiento de aversión por un lugar
CPP: Condicionamiento de preferencia por un lugar
CR: Respuesta condicionada
CRF: Factor liberador de corticotropina
CRF1: Receptor tipo 1 del CRF
CRF2: Receptor tipo 2 del CRF
CS: Estímulo condicionado
DMH: Núcleo dorsomedial del hipotálamo
DRN: Núcleo dorsal del rafe
ECS: Electrochoques
EM: Eminencia media
EPM: Laberinto elevado en cruz
ES: Estrés escapable
FH: Formación hipocampal
FS: choques eléctricos en las patas (footshock)
GEE: Ecuaciones estructurales generalizadas
GENLIN: Modelo lineal generalizado
GR: Receptor glucocorticoide
HPA: Eje hipotálamo-hipofisario-adrenal
IL: Corteza infralímbica
IMO: Inmovilización en plancha
IS: Estrés inescapable
ITI: Intervalo entre ensayos

LA: Amígdala lateral
LH: Learned helplessness (indefensión aprendida)
Lh: Núcleo lateral del hipotálamo
LS: Septum lateral
LTP: Potenciación a largo plazo
MC2-R: Receptor de melanocortinas, tipo 2
MeA: Amígdala medial
mPFC: Corteza prefrontal medial
MR: Receptor mineralocorticoide
MWM: Laberinto acuático de Morris
NS: Estímulo neutro
NTS: Núcleo del tracto solitario
PFC: Corteza prefrontal
POA: Área preóptica
PrL: Corteza prelímbica
PTSD: Trastorno de estrés post-traumático
PVN: Núcleo paraventricular del hipotálamo
RHA: Romans high-avoidance
RLA: Romans low-avoidance
ROF: Campo abierto rectangular
SMA: Sistema simpático-médulo-adrenal
SNC: Sistema nerviosos central
SPS: Sinlge prolonged stress
SPSS: Statistical Program for Social Science
TMT: Trimetiltiazolina
UR: Respuesta incondicionada
US: Estímulo incondicionado
vSUB: Subículum ventral

RESUMEN

Las consecuencias tanto fisiológicas como conductuales de la exposición al estrés (agudo o crónico) han sido ampliamente estudiadas durante décadas. Actualmente el interés por los efectos a largo plazo de una única exposición a un estímulo estresante ha cobrado un enorme interés respecto a la caracterización de modelos animales del Trastorno de Estrés Postraumático (PTSD). Existen importantes discrepancias entre los distintos modelos y uno de los objetivos de nuestro laboratorio ha sido comparar algunos de ellos. Así, la inmovilización en planchas (IMO) parecía ser un buen candidato, dado que es un estímulo estresante predominantemente emocional de intensidad elevada. Sin embargo, aunque la IMO es capaz de producir a largo plazo déficits en memoria declarativa y en la extinción de las memorias de miedo, no es capaz de inducir efectos ansiogénicos a largo plazo. En cambio, la exposición a sesiones muy breves de choques eléctricos, que desencadena cambios biológicos inmediatos mucho menos intensos que la IMO, es capaz de inducir efectos a largo plazo indicativos de mayor miedo/ansiedad, entre ellos hipoadividad en ambientes nuevos.

Los pacientes con PTSD se caracterizan por elevada ansiedad, sobreactivación del SNC, evitación de los lugares o estímulos asociados a la situación traumática, generalización del miedo a otros estímulos que guardan cierta similitud con la situación original y sensibilización frente a nuevas situaciones de estrés. Por lo tanto, aparecen procesos de condicionamiento del miedo, de generalización del miedo a otras situaciones y de sensibilización general frente al estrés, aspecto este último que representa un fenómeno no asociativo. La exposición a choques eléctricos es el modelo universal para el estudio del condicionamiento del miedo en el que pueden manifestarse los efectos mencionados anteriormente, pero apenas conocemos si otros estímulos estresantes como la IMO son igualmente eficaces. Los objetivos de la presente tesis se han centrado especialmente en la caracterización en ratas de los efectos asociativos de la exposición al choque eléctrico y la comparación de los efectos del choque eléctrico y la IMO. Nuestra hipótesis es que la ausencia de efectos a largo plazo de la IMO podría estar relacionada con la dificultad de este modelo para establecer condicionamiento del miedo. En los diversos experimentos se ha valorado no sólo la conducta sino también la respuesta de las hormonas del eje hipotálamico-hipofisario-adrenal (HPA), que se consi-

deran buenos marcadores de estrés, pero no han sido bien caracterizadas en estudios de condicionamiento del miedo. .

La exposición a choques eléctricos en un contexto determinado dio lugar a la aparición de un condicionamiento de miedo al contexto, observado tanto a nivel conductual como hormonal. Además, se observó inhibición a largo plazo de la actividad motora en ambientes nuevos que se mantenía tras exposición en días diferentes a ambientes distintos, pero no parecía asociada a mayores niveles de ansiedad medida en el laberinto elevado en cruz (EPM). Esta hipo-actividad parece ser un fenómeno asociativo dado que no se presenta cuando se aplica un protocolo que mantiene la exposición al choque eléctrico pero se impide el condicionamiento del miedo al contexto (déficit por choque inmediato). Parece por lo tanto un fenómeno de generalización del miedo (cautela) frente a cualquier ambiente desconocido. El estudio comparativo del condicionamiento del miedo al choque eléctrico y la IMO permitió replicar los resultados anteriores con el choque, en tanto que no se logró condicionamiento del miedo al contexto o a una señal específica relevante (la plancha) con la IMO, ni tampoco hipo-actividad en ambientes nuevos. Parece por lo tanto que el establecimiento de condicionamiento del miedo no es una propiedad universal de todos los estímulos estresantes con una componente predominantemente emocional y se confirma que la hipo-actividad en ambientes nuevos implicaría un proceso asociativo. Finalmente, se llevó a cabo un estudio para valorar la influencia del número y la intensidad de los choques eléctricos sobre los parámetros de interés, utilizando un contexto más amplio que el habitual en el que puede valorarse un mayor repertorio conductual (freezing, inmovilidad, actividad). Los resultados mostraron que la magnitud de los efectos conductuales condicionados no parecía depender ni de la intensidad ni del número de choques administrados, quizás debido a un efecto techo. Sin embargo, sí se observó una relación positiva entre la intensidad del choque y la generalización del miedo a otros ambientes nuevos. La extinción del miedo condicionado al contexto redujo de forma notable la hipo-actividad en ambientes nuevos.

El conjunto de datos presentados pone el foco de atención en la interpretación de las consecuencias a largo plazo producidas por una exposición a estí-

mulos estresantes. Estas consecuencias no siempre reflejan un aumento no asociativo de la ansiedad, sino que podrían estar mostrando una generalización del miedo a otros contextos que se puede revertir en parte mediante un proceso de extinción del mismo. Además, esta generalización del miedo parece estar relacionada con la intensidad del estímulo estresante. Parte de las consecuencias conductuales a largo plazo dependerían en gran medida de la capacidad de establecer un condicionamiento entre el contexto y el estímulo estresante. Como hemos observado con la IMO, no todos los estímulos estresantes tienen la capacidad de inducir dicho condicionamiento. La naturaleza del estímulo estresante (nocivo) utilizado y la "preparación biológica" del animal para establecer la asociación del estímulo nocivo con otro estímulo inicialmente neutro podría explicar algunas de las discrepancias importantes en los efectos conductuales a largo plazo entre diversos modelos de estrés. Los estudios realizados pueden ser importantes para el desarrollo de modelos animales más adecuados de PTSD y, sobre todo, para una adecuada interpretación teórica de las consecuencias a largo plazo de la exposición a estímulos estresantes.

INTRODUCCIÓN

1. CONCEPTO DE ESTRÉS

A principios del siglo XX, Walter B. Cannon, basándose en el concepto de “Milieu Interieur” acuñado por el fisiólogo francés Claude Bernard en el siglo XIX, introdujo el término “homeostasis” para referirse al conjunto de mecanismos fisiológicos que permitían al organismo afrontar las perturbaciones ocasionadas por los cambios en el ambiente, concepto esencial para la posterior definición del término estrés. Además destacó el sistema simpático-médulo-adrenal (SMA) como componente esencial del mantenimiento de la homeostasis y describió la respuesta de “lucha-huida” (fight or flight) como respuesta conductual frente a situaciones amenazantes. Aunque Cannon no definía el término estrés directamente en sus estudios, sí hacía referencia al mismo cómo los agentes adversos capaces de alterar el estado de equilibrio del organismo. Los agentes adversos no incluían únicamente estímulos físicos, sino que dio especial relevancia a los estímulos psicológicos, aspecto muy importante en el desarrollo de las posteriores definiciones de estrés (Goldstein y Mc Ewen, 2002).

Años más tarde, el endocrinólogo Hans Selye fue el primero que definió el término estrés tal y como lo conocemos actualmente. Lo definió como “la respuesta no específica del organismo frente a cualquier demanda sobre él”. A esta respuesta inespecífica y estereotipada la denominó “Síndrome General de Adaptación” (SGA), que se desarrollaría, independientemente del tipo de estímulo presentado, en tres fases: (i) reacción de alarma, (ii) adaptación, período de resistencia y (iii) agotamiento (Selye, 1936). Este síndrome generalmente iba asociado a una serie de efectos fisiológicos comunes, como pérdida de peso, hipertrofia adrenal, reducción del tamaño del timo y ulceración gástrica. En estudios posteriores destacó que los cambios fisiológicos observados estaban asociados a la liberación de glucocorticoides por parte de la corteza adrenal, convirtiendo así la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) en el aspecto fisiológico más relevante del estrés (Goldstein y Kopin, 2007).

Debido a la confusa terminología usada durante los primeros trabajos, Selye se vio obligado a distinguir los términos siguientes: Stressor referente al agente estresante y stress referido a la respuesta inespecífica del organismo. Actualmente, la terminología propuesta por Selye ha sufrido alguna modifica-

ción, considerando la distinción entre estímulo estresante (stressor), estrés (estado del organismo) y respuesta de estrés (Armario, 2006).

De la definición de Selye se desprende la idea de la existencia de una respuesta común del organismo frente a situaciones muy diversas, concepto que ha suscitado muchas críticas de autores posteriores (Armario 2000a). Si nos centramos en las respuestas endocrinas, observamos que la respuesta de los ejes SMA y HPA se da en todas las situaciones comúnmente consideradas como estresantes, por lo que podemos deducir que la respuesta de ambos ejes endocrinos conformaría la base de la respuesta no específica al estrés. Aunque las situaciones estresantes desencadenen una respuesta común no específica, simultáneamente también se desencadena una respuesta específica que es característica del estímulo estresante concreto al que se somete al organismo. Esta respuesta específica (destinada a mantener la homeostasis) será la primera en activarse, pero, si no es suficiente para restablecer el equilibrio homeostático, se pondrá en marcha la respuesta no específica (respuesta de emergencia) que es la que se denomina respuesta al estrés. No tener en cuenta esta diferenciación puede llevar a conclusiones erróneas, interpretando como respuesta al estrés una respuesta específica de un estímulo determinado.

Son muchos los autores que a lo largo de los años han revisado y ampliado la definición del concepto de estrés. Se han incorporado aspectos relevantes como el control o la predictibilidad de las situaciones estresantes (Armario, 2000b; Koolhaas et al, 2001; Le Moal, 2007), así como la naturaleza de los estímulos (Pacák y Palkovits, 2001), como factores relevantes para determinar los efectos negativos de la exposición a una situación estresante. Una de las definiciones más completas es la propuesta por Vigas (1984), que considera el estrés (o respuesta al estrés) como “la respuesta del organismo, desarrollada a lo largo de la filogenia, frente a agentes, reales o simbólicos, que ponen en peligro la integridad del organismo y no pueden afrontarse mediante los mecanismos hemostáticos normales”.

De la definición anterior se desprende la clasificación de los estímulos estresantes en dos grandes categorías, sistémicos y emocionales, aunque también existen estímulos mixtos (que compartirían características de las dos clasificaciones anteriores). Se consideran estímulos sistémicos o físicos aquellos que suponen un desequilibrio directo de la homeostasis, como infecciones, hipoxia, hemorragia o alteraciones metabólicas u osmóticas. Los estímulos emocionales son en cambio, aquellos que no constituyen una amenaza directa

para el equilibrio homeostático sino que tienen carácter anticipatorio de un peligro que sí podría ser real. El olor de un depredador o la exposición a un ambiente desconocido son un ejemplo de estímulos emocionales utilizados en los estudios en animales. Como se ha comentado anteriormente, existen estímulos que comparten características de ambas categorías, por ejemplo, el choque eléctrico, la inmovilización en plancha (IMO) o el nado forzado, fundamentalmente emocionales pero con un componente físico.

2. RESPUESTA DE ESTRÉS Y EJE HPA

Conjuntamente con la activación del eje SMA, la activación del eje HPA es otra respuesta fundamental y común a todas las situaciones estresantes. Su activación se ha relacionado directamente con la génesis de fisiopatologías y psicopatologías asociadas a la exposición a estímulos estresantes (Michelson et al, 1995) y por este motivo ha sido uno de los ejes neuroendocrinos mejor caracterizados (Armario, 2006).

2.1. EJE HIPOTÁLAMO-PITUITARIO-ADRENAL

El eje HPA está conformado por varios niveles anatómicos y su activación supone la liberación de varias hormonas. Independientemente de la naturaleza del estímulo estresante, toda la información procesada en el sistema nervioso central (SNC) converge en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN). Los estímulos emocionales activan el PVN tras su procesamiento en áreas telencefálicas como la corteza prefrontal (PFC), la amígdala, el septum o el estriado ventral. Los estímulos sistémicos lo hacen mediante vías más directas desde el tronco encefálico o las áreas circunventriculares (Herman y Cullinan, 1997). En respuesta al estrés se activan las neuronas parvocelulares del PVN que envían sus axones hasta la zona externa de la eminencia media (EM) donde liberan por exocitosis al sistema portal-hipofisario el factor liberador de corticotropina (CRF o CRH) y la arginina-vasopresina (AVP), entre otros. El principal factor liberador es el CRF, que lleva a cabo sus acciones mediante dos tipos de receptores: CRF1 y CRF2 (con dos subtipos CRF2 α y CRF2 β), los cuales están distribuidos de manera diferencial en el SNC (para revisión ver Bale y Vale, 2004). El CRF presenta mayor afinidad por los CRF1, principales responsables de la síntesis y liberación de ACTH. La AVP no estimula por sí misma la síntesis de ACTH pero sí que ejerce un papel en su

liberación, potenciando el efecto del CRF (Makara et al, 2004) a través el receptor V1a (también denominado V3) (Rivier y Vale, 1983).

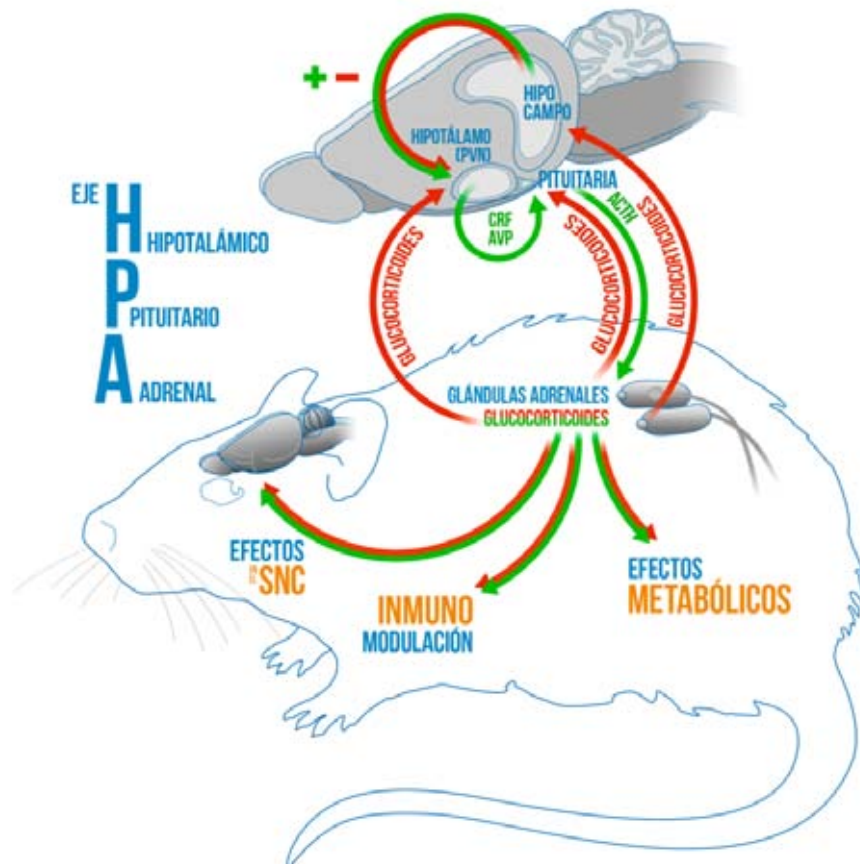


Figura 1. Esquema general del funcionamiento del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal. ACTH: Hormona adrenocorticotropa; AVP: arginina-vasopresina; CRF: factor liberador de corticotropina; PVN: núcleo para-ventricular del hipotálamo.

2.2. HORMONAS PERIFÉRICAS: ACTH Y CORTICOSTERONA

Como se ha expuesto anteriormente, cuando el CRF alcanza la adenohipófisis, estimula la síntesis y liberación de la hormona adenocorticotropa (ACTH) al torrente sanguíneo. El curso temporal de la liberación de ACTH es muy rápido, alcanzando su máximo a los 10-15 min. Una vez en la circulación general, la ACTH actúa sobre la zona fasciculata de la corteza adrenal y mediante los receptores transmembrana MC2-R (receptor de melanocortina 2) (Adan y Gipsen, 2000) estimula la síntesis y liberación de glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores). Los glucocorticoides, principales moléculas efectoras del eje HPA, ejercen multitud de funciones sobre el organismo y están implicados en la mayoría de consecuencias negativas asociadas al estrés.

Debido a la gran importancia de los efectos que ejercen los glucocorticoides en el organismo y en la regulación del eje HPA, es necesario desglosar las funciones de los glucocorticoides y diferenciarlas en dos categorías principales: moduladoras y preparatorias (revisión en Sapolski et al, 2000). A su vez, las funciones moduladoras se dividen en tres subtipos: permisivas, supresoras y estimuladoras. Las acciones permisivas son aquellas que ejercen los glucocorticoides antes de la exposición a una situación estresante, no son dependientes de la magnitud de su incremento y tiene como función preparar al organismo para afrontar el estrés. Las acciones supresoras, en cambio, sí dependen de la magnitud del incremento en los niveles de glucocorticoides, aparecen tras un hora o más después del inicio del estrés, y su función es prevenir los efectos negativos de una respuesta sostenida del organismo al estrés, inhibiendo las respuestas inmune e inflamatoria y la actividad del propio eje HPA (mediante mecanismos de retroinhibición negativa). Las acciones estimuladoras siguen el mismo patrón temporal que las supresoras y también dependen de la magnitud de respuesta de los glucocorticoides, pero, a diferencia de las acciones supresoras, éstas últimas potencian los efectos de otras hormonas liberadas durante la respuesta al estrés (por ejemplo potenciando la lipólisis o la glucogénesis). Finalmente las acciones preparatorias son aquellas que no afectan directamente a la respuesta inmediata a la situación estresante sino que modulan la futura respuesta a otra situación estresante, aspecto muy importante cuando se estudian situaciones de estrés crónico.

En función de los mecanismos subyacentes, los efectos de los glucocorticoides los podemos clasificar en dos grandes categorías: genómicos y no genómicos.

Todo y que se conocen bien los dos receptores intracelulares implicados en los cambios genómicos mediados por los glucocorticoides, el tipo I o mineralocorticoide (MR) y el tipo II o glucocorticoides (GR), los efectos rápidos producidos por los glucocorticoides no son compatibles con el tiempo requerido para la transcripción génica, por lo que se hace evidente la existencia de mecanismos no-genómicos (Makara y Haller, 2001). Se ha postulado que los efectos no-genómicos de los glucocorticoides estarían vinculados a receptores de membrana y en muchos casos estarían relacionados con la modulación de otros sistemas de neurotransmisores (efectos permisivos o inhibitorios). (Groeneweg et al, 2012). Los MR y GR se diferencian, en primera instancia, por su afinidad por los glucocorticoides. Los MR tienen mayor afinidad por la corticosterona (en rata) y suelen estar ocupados a nivel basal en un 80%. Los GR muestran una ocupación progresiva dependiente del incremento de los niveles plasmáticos de glucocorticoides, ya sean debidos a los cambios en la concentración producidos por el ritmo circadiano o como respuesta a una situación estresante (Reul y de Kloet, 1985). Otra característica diferencial es su distribución dentro del SNC (de Kloet et al, 1990), mientras que los MR tienen una localización muy específica, estando básicamente ubicados en la formación hipocámpal (FH), la amígdala central (CeA) y medial (MeA), los GR muestran una distribución más amplia, incluyendo zonas claves para el control de la retroinhibición negativa del eje HPA, como la corteza prefrontal medial (mPFC), la FH y el PVN (Armario, 2006). Estas diferencias en afinidad y localización ponen de manifiesto la diferenciación funcional de los dos tipos de receptores. En resumen, mientras los MR ejercen un control sobre los efectos tónicos de los glucocorticoides, los GR estarían implicados en el control y el retorno a condiciones basales del eje HPA después de la activación producida como respuesta a una situación estresante (Ratka et al, 1989).

2.3. RESPUESTA DEL EJE HPA E INTENSIDAD DE LOS ESTÍMULOS

Dejando de lado la naturaleza y características de los estímulos estresantes, uno de los aspectos básicos en los estudios del estrés es poder valorar el grado de severidad o intensidad del estímulo, dado que este factor es presumiblemente muy relevante para determinar las consecuencias conductuales y fisiológicas de la exposición a un estímulo estresante. Todo y que existen un gran número de variables fisiológicas que se modifican en situaciones de estrés,

sólo unas pocas responden en función de la intensidad del mismo. Por este motivo es necesario distinguir entre variables que son marcadores de estrés, y nos indican simplemente que podemos estar en una situación de estrés, y los marcadores de la intensidad del estrés, cuyo rango de respuesta es proporcional a la intensidad del estímulo estresante administrado. Dentro de esta última categoría se incluyen un número reducido de variables: los niveles plasmáticos de catecolaminas (especialmente la adrenalina), prolactina, hormonas del eje HPA (ACTH y corticosterona), y glucosa, así como, la reducción de la ingesta en los días posteriores al estrés (Martí y Armario, 1998; Márquez et al, 2002).

Existen diferentes factores que deben tenerse en cuenta cuando quiere escogerse un marcador de intensidad de estrés. Uno de los factores a tener en cuenta es el rango de sensibilidad de la variable a la intensidad del estímulo. Adrenalina, ACTH y prolactina, son variables muy reactivas puesto que con perturbaciones mínimas podemos observar grandes variaciones en sus niveles. Por el contrario, necesitamos una cierta intensidad mínima para observar cambios en la glucosa (Armario, 2006). Un ejemplo opuesto es la corticosterona. Debido a que la glándula adrenal se satura con niveles medios-bajos de ACTH, como los que se producen tras la exposición a un ambiente nuevo (Keller-Woods et al, 1983), en situaciones de mayor intensidad la respuesta de corticosterona se satura y no estaría reflejando adecuadamente los niveles de ACTH circulantes (Kant et al, 1983). Por este motivo la corticosterona, todo y representar una de las medidas más utilizadas en el estudio de respuesta endocrina al estrés, sólo sería adecuada para el estudio de estímulos de intensidad baja-moderada.

Las hormonas del eje HPA no sólo servirían como marcadores de la respuesta aguda a un estímulo cuando se valoran inmediatamente tras la exposición a la situación estresante, sino también durante el período post-estrés. Sabemos que la velocidad de recuperación de la respuesta del eje HPA también es capaz de discriminar la intensidad de una situación estresante (García et al, 2000), lo que permite poder diferenciar la intensidad de dos estímulos estresantes muy severos (choques de elevada intensidad e IMO), frente a las cuales la síntesis y liberación de ACTH también se ve saturada si se analiza justo después de la exposición (Márquez et al, 2002). Desde esta perspectiva, aunque los niveles de corticosterona medidos justo después de la exposición a un estímulo estresante no son una medida adecuada, la medida de esta variable

durante la fase de recuperación posterior al estrés sí nos estaría aportando información acerca de la intensidad del estímulo estresante.

Otro factor importante es la elección apropiada de los tiempos en los que se valora el parámetro en cuestión, teniendo en cuenta su dinámica de respuesta. La ACTH se caracteriza por una liberación rápida y puede medirse a partir de los 5 min del inicio del estímulo estresante. Si la situación estresante se mantiene en el tiempo observaremos un máximo a los 15 min. Aunque los niveles se pueden mantener elevados entre 30-60 min, posteriormente empiezan a disminuir lentamente hasta alcanzar incluso niveles basales a pesar de la persistencia del estímulo (Hauger et al, 1988). La liberación de corticosterona sigue una dinámica más lenta, observándose un máximo de respuesta entre los 15-20 min desde el inicio de la exposición al estrés cuando éste es muy breve. Si la situación estresante persiste, la respuesta puede alcanzar su máximo entre los 30-60 min (Dal-Zotto et al, 2004). Debido a las diferencias en la dinámica de respuesta, la ACTH no es una medida apropiada para valorar estímulos de larga duración (más de 1 h). En estímulos de corta duración (10-15 min), mientras la ACTH nos da una información más precisa, los niveles de corticosterona pueden no estar reflejando los niveles circulantes de ACTH, ya que debido a su dinámica es probable que no haya alcanzado aún su máximo de respuesta, pudiéndose encontrar paradójicamente niveles más elevados de corticosterona en el período de recuperación (una vez finalizado el estímulo estresante).

Además de ser un buen marcador de la intensidad del estrés, el eje HPA también ha mostrado ser una variable sensible al condicionamiento de miedo al contexto, tanto en animales condicionados con un choque eléctrico (Merino et al, 2000) como con olor de un depredador (Muñoz-Abellán et al, 2009) (ver apartado 5.2.2. Miedo condicionado y respuesta del eje HPA).

2.4. PROCESAMIENTO DE LOS ESTÍMULOS ESTRESANTES:

Independientemente de la naturaleza del estímulo estresante, toda la información procesada en el SNC converge en PVN desde donde se inicia la activación del eje HPA. Los estímulos sistémicos son aquellos que representan una amenaza real para la homeostasis del organismo y requieren de una acti-

vación rápida y directa del PVN. Debido a esto, las áreas relacionadas con la respuesta a estímulos sistémicos están en su mayoría directamente conectadas con el PVN. Así las proyecciones provenientes del núcleo del tracto solitario (NTS), relacionadas con la información somatosensorial, visceral o humoral, mediante aferencias predominantemente noradrenérgicas y adrenérgicas representan la vía excitadora principal y directa del eje HPA. Además el PVN recibe proyecciones directas de los órganos circumventriculares, caracterizados por carecer de barrera hematoencefálica, que se encargan de proporcionar la información sobre la presión osmótica y el balance de electrolitos (Herman et al, 2003; Jankord y Herman, 2008).

La exposición a estímulos emocionales da lugar a una respuesta anticipatoria del eje HPA. Un ejemplo de respuesta anticipatoria sería la que se genera por reacciones de miedo innatas (v.g. olor a un depredador o espacios abiertos) o mediante condicionamiento. El PVN está indirectamente interconectado con estructuras relacionadas con el sistema límbico, muy importantes para la regulación de la respuesta emocional y la memoria. La mPFC, la FH, la amígdala y el septum lateral (LS) son las principales estructuras relacionadas con el control del eje HPA frente a estímulos emocionales (para revisión Herman et al, 2005; Jankord y Herman, 2008). Estas estructuras no proyectan directamente al PVN, sino que requieren de núcleos intermedios en muchos casos constituidos por neuronas gabaérgicas. Los principales núcleos de relevo de la información son el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST), el área preóptica (POA), el núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMH), el núcleo arqueado del hipotálamo (Arc), hipotálamo lateral (Lh) y la zona peripVN.

La FH es una estructura que ejerce un efecto inhibitorio sobre el PVN. Por su gran densidad de receptores de glucocorticoides se le ha relacionado con la retroinhibición de la respuesta del eje HPA mediada por los glucocorticoides (Jacobson y Sapolsky, 1991). Este efecto es estímulo-dependiente, ejerciendo funciones inhibitorias sólo frente a estímulos de tipo emocional. Numerosos estudios usando lesiones y trazadores muestran que el efecto inhibitorio de la FH sobre el PVN es ejercida a través del BNST. Concretamente, la lesión de la parte ventral del subículo (vSUB) incrementa la respuesta del eje HPA frente a estímulos como la inmovilización en tubo o el campo abierto, sin afectar ni a los niveles basales del eje ni a la respuesta delante de estímulos puramente físicos como la inhalación de éter (Herman et al, 1998). El vSUB es la vía

de salida de la información del hipocampo hacia el hipotálamo. Utiliza señales estimuladoras (glutamatérgicas) que hacen sinapsis en neuronas GABAérgicas del BNST y el POA (subdivisión medial), entre otras estructuras hipotálámicas (Jankord y Herman, 2008).

Otra estructura que también tiene un papel inhibitorio sobre el PVN es la mPFC, específicamente la corteza prelímbica (PrL) y la infralímbica (IL). La lesión de la corteza PrL produce, del mismo modo que la lesión del vSUB, un aumento de la respuesta del eje HPA a los estímulos emocionales, sin afectar a los sistémicos (Figueiredo et al, 2003; Radley et al, 2009). Aunque se ha apuntado que la corteza IL estaría relacionada con la modulación de la respuesta a estímulos sistémicos, existe controversia acerca de su papel. La lesión de la mPFC no afecta a los niveles basales del eje HPA (Jankord y Herman, 2008). La mPFC no tiene sinapsis directas con el PVN sino que interactúa con numerosas áreas para ejercer su control inhibitorio sobre el PVN. Así, la PrL envía sus proyecciones glutamatérgicas al BNST, que a su vez, mediante proyecciones GABAérgicas inhibirá al PVN (Radley et al, 2009), al complejo basolateral de la amígdala (BLA) y el núcleo paraventricular del tálamo. Esta vía de procesamiento con origen en la PrL se ha visto especialmente activada delante de estímulos estresantes anticipatorios. La IL también proyecta directamente al BNST, a la CeA y al NTS, a través de las cuales ejerce su papel inhibitorio (Herman et al, 2005; Jankord y Herman, 2008).

La amígdala estaría ejerciendo un papel activador de la respuesta del eje HPA. La amígdala está compuesta por numerosos núcleos y aunque todos ellos pueden participar en la activación del eje HPA hay especificidades en función del estímulo presentado. La CeA está relacionada con la respuesta a estímulos sistémicos, mientras que la MeA, estaría más implicada en la respuesta anticipatoria frente a estímulos emocionales (Dayas et al, 1999; Herman et al, 2003). Ambos núcleos, mediante el envío de proyecciones GABAérgicas al BNST, que también es inhibitorio, pueden conseguir la excitación del PVN mediante un proceso de desinhibición. Además de proyectar al BNST, estos núcleos proyectan a otras áreas conectadas al PVN. Por ejemplo al POA (proyecciones provenientes de la MeA), área relacionada con la inhibición del eje HPA, y al NTS (proyecciones provenientes de la CeA) núcleo que juega un papel excitador (Herman et al, 2005; Jankord y Herman, 2008). Por último, el complejo BLA estaría relacionado preferentemente con la respuesta a estímulos emocionales; no parece tener un papel directo en la regulación de la

respuesta del eje HPA, pero podría ejercer sus efectos a través de proyecciones a otros núcleos de la amígdala (Jankord y Herman, 2008). Aunque no tenga un papel claro en el control de la actividad del eje HPA, el complejo BLA juega un papel clave en los efectos de los glucocorticoides sobre la memoria, especialmente la de tipo emocional (Roozendaal, 2000).

3. EFECTOS A LARGO PLAZO DE LA EXPOSICIÓN A UN ESTÍMULO ESTRESANTE

Las consecuencias fisiológicas y conductuales de la exposición a un estímulo estresante han sido estudiadas extensamente durante décadas. El foco principal de estudio estuvo siempre en las consecuencias a corto plazo. Está bien establecido que la exposición aguda a un estímulo estresante puede dar lugar a múltiples cambios conductuales y fisiológicos cuando se miden en un intervalo de tiempo de 24-48 h. El interés por los efectos a largo plazo del estrés vino de la mano de varias publicaciones a finales de los 80 y principio de los 90. Algunos estudios mostraron que la exposición breve a un estrés agudo podría provocar cambios a muy largo plazo sobre la respuesta a determinadas drogas (Antelman et al, 1988; 1989; 1991) o que la exposición a un paradigma de derrota social podría estar causando a largo plazo conductas que se podrían interpretar como ansiedad o depresión (Koolhaas et al, 1990).

El hecho de que una sola exposición a un estímulo estresante pudiera dar lugar a un abanico de efectos a largo plazo aumentó la relevancia de su uso para la búsqueda de modelos animales de psicopatologías humanas como el trastorno de estrés post-traumático (PTSD) u otros trastornos de ansiedad. En este trabajo nos hemos centrado en el estudio y caracterización de los efectos a largo plazo de la exposición al choque eléctrico y a la IMO, sin embargo, existen otros modelos, como por ejemplo el olor al depredador o el SPS "Single Prolonged Stress" ampliamente utilizados en el estudio de las consecuencias a largo plazo producidas por la exposición al estrés.

3.1. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A CHOQUES ELÉCTRICOS INTENSOS Y EL PARADIGMA DE LA INDEFENSIÓN APRENDIDA

El modelo clásico del paradigma de la indefensión aprendida (Maier, 1984), suponía la administración en la cola de un elevado número de choques eléctricos de alta intensidad. Este diseño constaba de tres grupos de animales, que se colocaban dentro de recintos que les restringían el movimiento. Uno de ellos, tenía la posibilidad de escapar de los choques eléctricos que se le administraban en la cola (ES) aprendiendo a realizar una tarea (girar una rueda o apretar una palanca). Otro animal estaba en otro recinto similar conectado a la primera jaula y recibe tantos choques como el primero, con la diferencia de que no tenía ningún control sobre la terminación de los choques (IS). El último animal se utilizaba de control y simplemente permanecía en un recinto similar pero sin recibir choque eléctrico (en ocasiones se utilizan como control animales que permanecen siempre en la jaula habitual). En este paradigma, el número de choques que reciben los animales sólo viene determinado por la rapidez y el número de veces que el animal 1 (ES) es capaz de detener los choques con la tarea instrumental. Generalmente un día más tarde, todos los animales eran sometidos a una tarea de escape, donde eran expuestos a una shuttle box en la que se les administraban choques sin señalar. No se observaban diferencias entre los grupos cuando los animales eran sometidos a un protocolo de FR1 (solo es necesaria una sola respuesta para detener el choque) en la tarea de escape, pero se hacían patentes cuando la tarea se volvía más exigente, como por ejemplo en un protocolo FR2 (son necesarias dos respuestas para detener el choque). En este último, los animales IS mostraban una mayor conducta de freezing y una menor tasa de escape que los ES y los controles (Maier, 1990).

En base a estos resultados, se desarrolló la hipótesis (Maier y Watkins, 2005) de la indefensión aprendida (learned helplessness, LH), que asumía que aquellos animales que previamente habían recibido choques eléctricos en la cola sobre los cuales no tenían ninguna capacidad de control (IS) perdían la motivación por desarrollar conductas activas frente a otras situaciones distintas a la situación estresante original. Sin embargo, la posible existencia de un déficit cognitivo, basado en la incapacidad por asociar la propia conducta con las consecuencias de la misma, también se ha barajado como posible explicación para el fenómeno de la LH. Estos estudios ponían de manifiesto la importancia del fenómeno de la controlabilidad, de tal modo que, la falta de control sobre las situaciones estresantes se presenta como una posible causa de al menos una parte de los efectos adversos producidos por la exposición a choques eléctricos. No obstante, se desarrollaron teorías alternativas acerca del

origen del déficit en la conducta de escape producido por la exposición al IS no relacionadas con procesos cognitivo. En el laboratorio de Weiss y colaboradores (Glazer et al, 1975) postularon la hipótesis del “déficit de la actividad motora”. El déficit en la tarea de escape estaría relacionado con la disminución de la actividad monoaminérgica, que se produciría tras la exposición a un estrés de elevada intensidad. Sus datos mostraban la existencia de una correlación positiva entre la demanda motora de la tarea de escape y la aparición del déficit, observando una reducción o incluso la no aparición del déficit cuando la tarea de escape demandaba poca actividad motora. Asimismo eran capaces de reproducir el déficit en la conducta de escape con la administración, antes de la prueba de escape, de fármacos que interferían con la actividad monoaminérgica. No obstante, la disminución de monoaminas producidas por una sola exposición a un estímulo estresante es un fenómeno transitorio (Anisman et al, 1985) y podría explicar sólo el déficit observado a corto plazo, pero no el déficit encontrado varios días después. Otra hipótesis alternativa se basa en la “competencia de respuestas”. La exposición al IS tendría como consecuencia el desarrollo de conductas pasivas (v.g. freezing) que son incompatibles con la realización de la tarea de escape. De este modo, se sugirió (Anisman et al, 1978) que los déficits en la conducta de escape observados a corto plazo podrían ser debidos a una disminución de la transmisión monoaminérgica, pero, el déficit observado a largo plazo estaría relacionado con la capacidad del IS de inducir un comportamiento pasivo (freezing) incompatible con una conducta posterior de escape. Observaron que la modulación de la duración y la intensidad del choque (IS) influenciaban posteriormente la realización de la tarea de evitación del mismo modo que influenciaba la conducta de los animales en un campo abierto. Así, los IS de larga duración, asociados a una disminución de la actividad, inducían mayores déficits de escape, mientras que los IS de corta duración, asociados a un aumento de la actividad, solían mostrar ausencia de efecto. En este sentido, se ha observado una correlación positiva entre el tiempo de inactividad durante la exposición al IS y el déficit de escape/evitación, obteniendo mayores latencias de escape en aquellos animales con menor actividad el día del estrés (Murua y Molina, 1991). Este aumento de la latencia de escape era revertido por la administración crónica tanto previa como posterior al IS de fármacos antidepresivos, mostrando que de manera general los antidepresivos pueden estar favoreciendo la adopción de conductas activas.

Estudios posteriores han mostrado efectos a corto plazo no sólo sobre la conducta de escape, sino también incrementando la neofobia y disminuyendo la interacción social (Maier y Watkins, 2005). Sin embargo, uno de los principales problemas de este modelo es que no se observan efectos duraderos, pues normalmente se disipan a los largo de las 72 h post-estrés.

Sorprendentemente, todo y los resultados negativos que se obtenían cuando se estudiaba este déficit a largo plazo, algunos trabajos eran capaces de observar déficits en la conducta de escape al cabo de varios días. Sin embargo, aquellos estudios que obtenían resultados positivos estaban utilizando el mismo contexto o, un contexto muy similar, tanto para la administración de los choques eléctricos como para la prueba de escape (Murua y Molina, 1991; Maier y Watkins, 2005). La realización de la prueba de escape en un contexto previamente condicionado, tenía como resultado el mantenimiento del déficit más allá de las 48-72 h implicando efectos condicionados. En este sentido, un trabajo de Maier (2001) ha mostrado que la exposición a IS (choque en la cola) inducía un déficit en la tarea de escape sólo observable hasta 48 h post-estrés (como es habitual). Pero, si los animales eran expuestos repetidamente, a partir de las 48 h, al contexto dónde habían recibido los IS a modo de recordatorios (reminder) (8 veces, 1 cada 48 h) el déficit se mantenía hasta 22 días post-estrés (2 días después del último reminder). En conjunto, estos datos ponen de manifiesto la importancia del contexto, sugiriendo que el condicionamiento de miedo al contexto puede ser un factor fundamental para el desarrollo de los efectos conductuales encontrados en algunos de los modelos que utilizaban el choque eléctrico.

En los estudios de LH se ha descrito otro efecto llamado "inmunización conductual". Este fenómeno muestra cómo la exposición previa a un estrés controlable (ES) inmuniza o amortigua los efectos negativos de un estrés incontrolable (IS) aplicado posteriormente (7 días más tarde). Así, la exposición previa a un ES es capaz de bloquear el déficit producido por el IS en la latencia de escape en la shuttle box (Amat et al, 2006). Sorprendentemente, un estudio de Amat y colaboradores (2010) muestra que la exposición previa a ES no sólo es capaz de bloquear los efectos negativos del IS (choque eléctrico) en una tarea de escape, sino que revierte los efectos provocados por la exposición a una situación totalmente diferente, observando un efecto protector de la disminución de la interacción social causada por la derrota social.

Es en relación al condicionamiento del miedo dónde se han encontrado más datos positivos respecto a la aparición de efectos a largo plazo de la exposición al IS. La exposición al IS produce miedo condicionado al mismo contexto dónde se ha recibido el IS, el cual es más prolongado en el tiempo que el déficit producido en la tarea de escape (Maier et al, 1993). Además, el IS es capaz de potenciar tanto el miedo al contexto (otro contexto distinto) como a una clave 7 días después de la exposición a IS. Por el contrario, la exposición a ES induce un efecto protector frente a un condicionamiento del miedo posterior (Amat et al, 2005; Baratta et al, 2007), mostrando en animales, menores niveles de freezing frente al contexto y frente a una clave cuando han sido expuestos al ES antes de la adquisición del condicionamiento del miedo. Si la exposición al ES se produce tras la adquisición (24 h) se observa una mayor rapidez en la extinción y una reducción de la CR tras la recuperación espontánea. Cabe destacar que estos efectos protectores del ES aparecen respecto al grupo sometido a IS, pero también al grupo control (Baratta et al, 2007).

En términos de la respuesta del eje HPA, la exposición a una sesión de choques eléctricos en la cola típica del LH, produce una sensibilización de la respuesta frente a nuevos estímulos estresantes, tanto emocionales como sistémicos (Johnson et al, 2002). Esta sensibilización se observa de 24 h a 10 días post-estrés y desaparece a los 21 días. Asimismo, este aumento de la respuesta del eje HPA va acompañado de un aumento de la resistencia a la inhibición inducida por dexametasona, un glucocorticoide sintético (O'Connor et al, 2003). Es importante mencionar que la administración de choques de elevada intensidad causa la misma respuesta de ACTH y corticosterona, tanto si son controlables como si no, sin mostrar tampoco diferencias en la dinámica de recuperación de los niveles basales de estas dos hormonas (Maier et al, 1986). La sensibilización a largo plazo de la respuesta del eje HPA a otros estímulos estresantes es también independiente de la controlabilidad. Esta sensibilización de la respuesta hormonal está bien establecida también tras la exposición a otros estímulos estresantes de intensidad elevada como la inmovilización en plancha (IMO) (Belda et al, 2008, Gagliano et al, 2008).

Respecto al procesamiento de las situaciones escapables o inescapables por el SNC (para revisión Maier et al, 2006), hay muchos datos que relacionan la parte dorsal del núcleo del rafe (DRN) con los efectos conductuales adversos producidos por la exposición a un IS. Se ha observado que la exposición a IS, en comparación con el ES, produce una activación mayor de las neuronas

serotoninérgicas del DRN (Maswood et al, 1998). La inactivación farmacológica del núcleo, tanto en el momento del estrés como del test, bloquea los efectos negativos conductuales derivados de la exposición a IS (Maier et al, 1994). Otra estructura fundamental es la mPFC que proporciona información sobre la controlabilidad del estrés y proyecta directa e indirectamente al DRN (Amat et al 2005, 2006). La hipótesis que sostienen los autores es que el DRN se activaría per se con la exposición al estrés, pero la posibilidad de control permitiría que la parte ventral de la mPFC (IL) inhibiera, a través de interneuronas GABA, la actividad del DRN. Así, la inactivación con muscimol de la IL antes de la ejecución de la prueba de escape revierte el efecto protector de la exposición previa al ES. Del mismo modo, la inactivación antes de la exposición a un condicionamiento de miedo, también producía la pérdida del efecto protector del ES, obteniendo niveles similares de freezing en los animales ES con la IL inactivada que en los animales sometidos a IS.

3.2. SESIONES CORTAS DE CHOQUES ELÉCTRICOS

En la década de los 90 el laboratorio de Tilders demostró que la exposición aguda a choques eléctricos en las patas de baja-mediana intensidad producía hipo-actividad en ambientes nuevos incluso 4 semanas después de la exposición a la sesión de estrés (Van Dijken et al, 1992a; 1992c; 1993). A raíz de estos primeros estudios, otros laboratorios observaron también una disminución de la actividad a largo plazo tras una sesión corta de choques eléctricos administrada en la cola (Servatius et al, 1994), o en las patas (Van den Berg et al, 1998). Aunque en primera instancia los autores relacionaron estos resultados con una posible sintomatología depresiva, la ausencia de efectos de la administración tanto aguda como crónica de antidepresivos sobre la hipo-actividad arrojaba dudas sobre la interpretación de los resultados (Van Dijken et al, 1992b).

Estudios posteriores mostraron que la exposición a una sesión aguda de 10 choques eléctricos producía, hasta 10 semanas después, un aumento de la latencia de salida y una disminución del tiempo en el compartimiento iluminado en la prueba de luz-oscuridad (Bruijnzeel et al 2001a; 2001b), que se interpretó como un aumento de la ansiedad. Pero esta interpretación no viene apoyada por otros datos que muestran que los efectos a largo plazo del choque no son sensibles a la administración de ansiolíticos (Bruijnzeel et al,

2001a) o antagonistas del CRF (Bruijnzeel et al, 2001b) antes de la prueba de luz-oscuridad. Existen muchos otros estudios que no apoyan la interpretación de los efectos a largo plazo producidos por la exposición aguda al choque eléctrico como un aumento de la ansiedad. Por ejemplo, la exposición a choques eléctricos puede reducir la respuesta de sobresalto (Pijlman et al, 2003), aumentar las conductas de evitación activa en la shuttle box y aumentar las estrategias activas en la prueba del nado forzado (Van Dijken et al, 1992a), todos estos efectos indicativos en todo caso de una disminución de la ansiedad.

En conjunto, los resultados anteriores apuntan a la existencia de una disociación entre la hipo-actividad en ambientes nuevos y la ansiedad. Un estudio realizado por Radulovic y colaboradores (1998a) aporta datos importantes a favor de esta disociación. Estos autores mostraron que la administración de un choque eléctrico producía hipo-actividad cuando los animales eran expuestos al laberinto elevado en cruz (EPM) y sin embargo, no mostraban una reducción del tiempo en los brazos abiertos. Por el contrario, la hipo-actividad iba acompañada de un aumento del tiempo de permanencia en los brazos abiertos, lo cual es indicativo normalmente de una disminución de la ansiedad.

Respecto a los efectos a largo plazo de la exposición previa a choques eléctricos de intensidad baja o moderada sobre la respuesta del eje HPA a nuevos estímulos, se ha observado una sensibilización de la respuesta a largo plazo (14 días después) (Van Dijken et al, 1993). Sin embargo, pocos estudios posteriores han mostrado estos efectos a largo plazo, lo que podría interpretarse como una consecuencia observable sólo en animales particularmente sensibles al estrés.

Algunos estudios más recientes han aportado datos interesantes en relación al uso de sesiones breves de choque eléctrico como posible modelo animal para el estudio del PTSD. El laboratorio de Wotjak ha mostrado como en una determinada cepa de ratones (C57BL/6N), una sola exposición a un choque eléctrico es capaz de inducir 28 días más tarde efectos que pueden resultar análogos a algunos de los síntomas observados en los pacientes con PTSD (Siegmung y Wotjack, 2007a; 2007b). Los efectos encontrados son: (i) la aparición de miedo condicionado al contexto donde se experimenta la situación traumática (síntomas asociativos), (ii) sensibilización del miedo a otros estímulos no asociados con el estímulo traumática (síntomas de hiperarousal, no

asociativos), (iii) signos de neofobia y evitación social y (iv) aumento de conductas pasivas en la prueba de natación forzada. Sin embargo, el hecho de que estos efectos tan duraderos sólo sean observados en una cepa de ratones concreta (C57BL/6N) pueden deberse a que sea una cepa especialmente sensible al estrés (Siegmund y Wotjack, 2007b)

3.3. SINGLE PROLONGUED STRESS (SPS):

Este modelo, propuesto por Liberzon y colaboradores (Liberzon et al, 1997), se caracteriza por la combinación de 3 estímulos distintos en el mismo día. Los animales son expuestos a 2 h de inmovilización en tubo (restraint), seguidas de 20 min de nado forzado a 24°C, y tras un periodo de recuperación de 15 min, expuestos a éter hasta la pérdida de consciencia. Generalmente, entre 7 y 14 días después se lleva a cabo la evaluación de los efectos a largo plazo.

Una de las características principales de este modelo es la capacidad para producir efectos a largo plazo (semanas) en pruebas de ansiedad. Diferentes estudios han mostrado que la exposición al SPS es capaz de inducir un aumento a largo plazo (entre 7 y 14 días dependiendo del estudio) de la ansiedad, valorada mediante la prueba de sobresalto acústico (Khan y Liberzon, 2004; Kohda et al, 2007) y el EPM (Imanaka et al, 2006). También se ha observado un aumento de la inmovilidad en la prueba de natación forzada 7 días tras la exposición al SPS (Yamamoto et al, 2009). Estos resultados fueron interpretados por los autores como un aumento del miedo relacionado con la exposición a una situación relacionada con el evento traumático, es decir, que el aumento de la inmovilidad era un efecto condicionado. Sin embargo, la exposición al nado forzado no podría considerarse estrictamente como una exposición a un estímulo relacionado con la situación traumática, sino una segunda exposición al mismo estímulo, por lo que el aumento de inmovilidad podría deberse simplemente a la experiencia previa de que la situación es inescapable.

Diversos estudios han valorado los efectos del SPS sobre el condicionamiento de miedo al contexto. Una exposición al SPS 7 días antes del condicionamiento producía un aumento de la memoria de miedo al contexto inducida por un choque eléctrico. Curiosamente, este efecto potenciador del condicionamiento no se observa un día después del SPS, sugiriendo que la aparición de

estos efectos requiere un proceso de incubación (Takahashi et al, 2006; Kohda et al, 2007; Iwamoto et al, 2007). Tratamientos crónicos con paroxetina, un antidepresivo, (Takahashi et al, 2006), o cicloserina, un agonista parcial de los receptores tipo NMDA, (Kohda et al, 2007), iniciados justo después de la exposición al SPS, fueron capaces de revertir el efecto potenciador de la memoria del miedo. Asimismo, la administración de un antagonista GR antes de la exposición al SPS (Kohda et al, 2007) también mostró el mismo efecto protector. En algunos estudios se han descrito también efectos negativos del SPS sobre la extinción del miedo condicionado. Animales expuestos a SPS una semana antes del condicionamiento mostraban déficits en la extinción del mismo (sin que se observaran diferencias el día del test) que podían ser revertidos con la administración repetida de cicloserina durante la extinción (Yamamoto et al, 2008). Estos efectos del SPS sobre la extinción también requerirían de un periodo de incubación y estarían relacionados con un déficit de consolidación de la extinción, dado que los animales sometidos a SPS, todo y llegar al mismo grado de extinción, mostraban una mayor recuperación espontánea de la respuesta de miedo (freezing) (Knox et al, 2012).

Es interesante remarcar que el interés inicial del SPS fue evaluar los efectos de la exposición previa a este modelo sobre la respuesta del eje HPA frente al estrés. Se observó que la exposición previa al SPS no modificaba la respuesta del eje HPA a un estrés agudo como la inmovilización en tubo, pero sí que provocaba una sensibilización del feedback negativo, mostrando menores niveles de ACTH y corticosterona cuando se administraba cortisol 30 min antes de la exposición al estrés (Liberzon et al, 1997). Sin embargo, es necesario remarcar que el uso de uno de los estímulos estresantes que conforman el protocolo SPS para la segunda exposición (inmovilización en tubo), podría estar produciendo una desensibilización homotípica (Armario et al, 2004), hecho que podría estar enmascarando posibles efectos sensibilizadores del SPS delante de estímulos heterotípicos.

Muchos de los efectos encontrados en este modelo se asemejan a la sintomatología del PTSD: hipersensibilidad del feedback negativo del eje HPA, aumento en los niveles de ansiedad, potenciación de las memorias aversivas y déficits en la extinción de las mismas. La capacidad de inducir todos estos efectos a largo plazo y la existencia de un periodo de incubación para la aparición de los mismos, apoyan que sea considerado como un posible modelo animal del PTSD (Stam, 2007).

3.4. OLOR AL DEPRADOR:

Un modelo que ha propiciado numerosos estudios en los últimos tiempos ha sido la exposición al depredador o al olor al depredador, que posee gran interés por su carácter etológico comparado con otros estímulos estresantes ampliamente utilizados como el choque eléctrico. Podemos encontrar diferentes versiones de este modelo. Hay estudios que utilizan la exposición directa al depredador, permitiendo o no el contacto directo (en el caso de los animales de laboratorio el gato sería el depredador natural de la rata o el ratón), o materiales impregnados con el olor del depredador, tanto de orina, heces o piel/pelo, o incluso una sustancia sintética derivada de las heces del zorro (trimetiltiazolina, TMT).

En los estudios de los efectos a largo plazo de la exposición directa al gato el procedimiento habitual consiste en una exposición de 5 min en un espacio abierto. Esta exposición desencadena, además del condicionamiento de miedo al contexto, un aumento de la ansiedad inmediatamente después de la exposición que puede mantenerse hasta 21 días después (Adamec y Shallow, 1993; Adamec et al, 1998). En concreto una semana después de la exposición puede observarse una disminución del tiempo de permanencia y del número de entradas en los brazos abiertos del EPM y un aumento de la amplitud de respuesta de sobresalto acústico, lo que podría estar indicando, además de un aumento de la ansiedad, un estado de hipervigilancia o arousal exagerado (Adamec et al, 1998). Sin embargo los resultados obtenidos en otras pruebas relacionadas con ansiedad, como la prueba de luz-oscuridad, o la interacción social no son muy consistentes (Adamec et al, 2007). Estos efectos en el EPM no van acompañados de una disminución de la actividad locomotora/exploratoria, medida en otros ambientes nuevos (Adamec et al, 1993; 1998). Un dato interesante a destacar en este modelo es la relación entre la intensidad de la exposición al gato y sus efectos ansiogénicos a largo plazo. Los efectos ansiogénicos encontrados cuando se expone al animales directamente al depredador son mucho más intensos que cuando el modelo se lleva a cabo usando el olor del depredador (Adamec et al, 1998).

Los modelos de exposición a diferentes olores podrían estar induciendo diferentes efectos a largo plazo. Mientras que la exposición a la orina y a las heces de gato produce comportamientos defensivos a nivel agudo, sólo la exposición a la piel del gato desencadena, además de los comportamientos defensivos agudos, comportamientos de miedo condicionado al contexto asociado a la exposición al olor, junto con un aumento de la ansiedad (Blanchard et al, 2003a; Muñoz-Abellán et al, 2008). Sin embargo, otros laboratorios sí encuentran efectos a largo plazo de la exposición a la orina/heces del gato, como la disminución del tiempo de permanencia en los brazos abiertos del EPM (Cohen et al, 2004). Respecto al uso de olores sintéticos, como el TMT, aunque aportan la ventaja de que son fácilmente cuantificables, los efectos en ratas son controvertidos. Aunque el TMT es capaz de producir conductas defensivas delante del estímulo olfativo, no son tan intensas como las producidas por la exposición al olor del gato y tampoco son sensibles a la administración de ansiolíticos (Mc Gregor et al, 2002; Fendt et al, 2005). Los efectos del TMT sobre la conducta ansiosa a corto (McGregor et al, 2002), y a largo plazo (Hebb et al, 2002; 2003) también son contradictorios. Sin embargo, la falta de efectos condicionados asociados al contexto es la mayor crítica a la que se enfrenta el uso de esta sustancia química (Mc Gregor et al, 2002; Blanchard et al, 2003b). En resumen, los datos apoyan la idea de que la TMT resulta aversiva pero no ansiogénica.

La exposición de los animales a una pieza de ropa o collar impregnado con el olor del gato produce a corto plazo conductas defensivas, y a largo plazo se observan evidentes conductas de miedo condicionado al contexto y en algunas ocasiones cambios en los niveles de ansiedad medidos en el EPM (Cohen et al, 1999; McGregor et al, 2002; Muñoz-Abellán et al, 2008). Sin embargo, no parece tener efectos importantes a largo plazo sobre la prueba de sobresalto acústico o en la prueba de interacción social (Mackenzie et al, 2010).

En este contexto, nuestro laboratorio ha llevado a cabo diversos estudios para describir cuales son los efectos a largo plazo producidos por este tipo de exposición. Los datos obtenidos indican una falta de consistencia en los efectos ansiogénicos a largo plazo, ya que todo y que la exposición a la ropa impregnada con olor de gato es capaz de producir en todos los casos efectos condicionados (evaluados días más tarde), los efectos ansiogénicos no aparecen tan consistentemente. En algunos casos se ha observado un incremento de la ansiedad valorada por la conducta en el EPM (Muñoz-Abellán et al, 2008),

que está en consonancia con los obtenidos en otros laboratorios (McGregor et al, 2002), mientras que en otros estudios no hay efectos ansiogénicos (Muñoz-Abellán et al, 2009). Datos posteriores han mostrado que el grado de afectación de los animales dependía del gato que se estaba utilizando para la exposición (Muñoz-Abellán et al, 2010). Estos datos, conjuntamente con los de otros laboratorios (Blanchard et al, 2003a), ponen de manifiesto la existencia de variables del procedimiento que pueden afectar a los efectos a largo plazo, dificultando así la comparación de resultados entre laboratorios y dentro de un mismo laboratorio.

Aunque la exposición a la orina/heces de gato no ha mostrado resultados muy consistentes, y existe una cierta polémica sobre su efectividad (Blanchard et al, 2003a), el grupo de Cohen ha basado todos sus trabajos en este modelo. La exposición de los animales al lecho de gato (orina) induce a largo plazo (7 días después) efectos ansiogénicos en el EPM (Cohen et al, 2003) y en la prueba de sobresalto acústico (Cohen et al, 2004) y estos efectos pueden demorarse hasta un mes (Cohen et al, 2004). La aportación más interesante de estos trabajos es la categorización de los animales entre “afectados” y “no afectados” utilizando la conducta en el EPM y en la prueba de sobresalto acústico (Cohen et al, 2004). Esta caracterización de las diferencias individuales es de gran interés, y el hecho de que no todos los animales resulten afectados (sólo un 25% mostraba efectos a largo plazo) le da, a su vez, validez como un posible modelo animal de PTSD (Cohen y Zohar, 2004).

Desde el punto de vista de la activación del eje HPA, la exposición al olor del depredador induce un aumento moderado de los niveles de ACTH y corticosterona (File et al, 1993; Cohen et al, 2003; Muñoz-Abellán et al, 2008). Un dato interesante a remarcar es la disociación entre la modesta activación del eje HPA y la aparición de efectos a largo plazo producidos por la exposición al depredador, al contrario de lo que se observa con otros estímulos más severos, como la IMO, que causa una gran activación del eje HPA con pocas consecuencias conductuales aparentes a largo plazo. (Muñoz-Abellán et al, 2008). En estos estudios, el eje HPA se ha mostrado como una variable sensible para medir la respuesta condicionada. Los animales expuestos al olor del depredador muestran una mayor respuesta de ACTH y corticosterona que los animales controles tras la exposición al contexto asociado al olor, pero no frente a otro contexto no asociado al estímulo estresante (Muñoz-Abellán et al, 2009).

3.5. INMERSIÓN FORZADA:

Uno de los primeros modelos en los que se describieron efectos conductuales a largo plazo fue el de la inmersión forzada (Richter-Levin, 1998), consistente en la inmersión total forzada dentro del agua de los animales durante 30-60 sec. Esta exposición produce a corto (1 h) y a largo plazo (3 semanas) un déficit de memoria en la prueba del laberinto acuático (MWM). Sin embargo, el efecto sobre la memoria sólo se encontraba cuando los animales habían sido estresados en el tanque donde se realizaba la prueba del MWM y no en uno distinto. Este hallazgo ponía de manifiesto la aparición de un componente asociativo que podía ser el origen del déficit de memoria. Asimismo, además de los déficits dependientes de contexto encontrados en el MWM, los animales expuestos a la inmersión forzada mostraban un aumento de la ansiedad medida en el EPM (Richter-Levin, 1998) y un aumento de la respuesta de sobresalto acústico (Cohen et al, 2004), conductas asociadas a un aumento de la ansiedad y observables hasta 30 días tras la exposición al estrés.

3.6. INMOVILIZACIÓN EN TABLA (IMO):

La IMO es un estímulo exhaustivamente estudiado en nuestro laboratorio tanto a nivel fisiológico como conductual, y podríamos definirlo como un estímulo estresante de alta intensidad si tenemos en cuenta todos los marcadores clásicos de intensidad del estrés (Armario y Jolín, 1989; Martí et al, 2001). Una exposición aguda a la IMO provoca una respuesta inicial muy elevada del eje HPA, mostrando también una dinámica de recuperación más lenta que otros estímulos también considerados severos como los choques eléctricos de elevada intensidad (Márquez et al, 2002). Una única exposición a la IMO provoca una reducción a largo plazo (días o semanas) de la respuesta del eje HPA a la exposición al mismo estímulo (desensibilización homotípica). Esta reducción de la respuesta no siempre es observada en la respuesta inicial pero sí aparece de manera consistente una recuperación más rápida de los niveles basales (Martí et al, 2001; Dal-Zotto et al, 2002; 2003; Vallés et al, 2003). Esta reducción de la respuesta al mismo estímulo refleja un proceso de aprendizaje asociado a la experiencia con el mismo estímulo. En cambio, del mismo modo que ocurre con otros estímulos estresantes severos, una sola exposición a la IMO es capaz de provocar una sensibilización hormonal del

eje HPA frente a otros estímulos estresantes (sensibilización heterotípica) que suele durar varios días (Belda et al, 2008; Gagliano et al, 2008).

A nivel conductual, la IMO no es capaz de inducir alteraciones a largo plazo (1 semana) en la actividad en ambientes nuevos a pesar de inducir, como hemos comentado antes una sensibilización de la respuesta del eje HPA delante de las mismas situaciones (Belda et al, 2004; Gagliano et al, 2008). Sin embargo, sí se ha observado una disminución del consumo de sacarina durante unos 5 días después de una exposición aguda, efectos relacionados con un posible estado anhedónico (Rabasa et al, datos no publicados). Asimismo una sola exposición a la IMO puede inducir cambios en la ansiedad valorados en el EPM hasta 7 días después, efecto que ha desaparecido ya a las 2 semanas. Sin embargo, es importante remarcar que cuando los animales son expuestos (10 días después de la exposición a la IMO) a un estímulo estresante de baja intensidad (choque eléctrico suave), que por sí solo no produce ningún efecto sobre la ansiedad, los efectos ansiogénicos reaparecen, observándose de nuevo una disminución del tiempo y el número de entradas en los brazos abiertos del EPM. Estos resultados sugieren un posible efecto sensibilizador a largo plazo de la IMO que está latente y sólo se manifestaría cuando los animales son expuestos posteriormente a una nueva situación de estrés, incluso de baja intensidad (Belda et al, 2008). Además, en algunas ocasiones una sola exposición a la IMO da lugar a un aumento de la respuesta de sobresalto acústico 10 días más tarde, indicativo también de un aumento de la ansiedad, aunque los resultados no son siempre consistentes (Fuentes et al, datos no publicados).

Los efectos de la IMO sobre el condicionamiento del miedo han sido estudiados en ratones, con un protocolo de condicionamiento asociado a un tono (ver apartado 5.2. Condicionamiento del miedo: contexto experimental). En particular, la exposición previa al condicionamiento a 2 h de IMO (6 o 12 días antes) produce un empeoramiento de la extinción del miedo condicionado valorado a las 24 h post-adquisición. Este déficit es bloqueado por la administración de 7,8-DHF, un agonista del receptor TrkB del BDNF, cuando es administrado antes de iniciar el programa de extinción (Andero et al, 2011).

Por otro lado, la exposición a 2 h de IMO induce déficits en tareas dependientes de hipocampo, concretamente sobre la memoria espacial en el MWM (Andero et al, 2012). Este estudio muestra que la exposición a la IMO (3 o 9 días antes del inicio del aprendizaje) no produce ninguna alteración en el

aprendizaje; pero sí en la memoria declarativa a largo plazo. Los animales sometidos previamente a una IMO, todo y alcanzar el mismo nivel de aprendizaje, mostraban una disminución del tiempo de estancia en el cuadrante objetivo en prueba de memoria (sin plataforma) 24 h después del último entrenamiento. La administración del agonista TrkB (7,8-DHF) era capaz tanto de bloquear los efectos de la IMO sobre la memoria si era administrado antes de la IMO (2 h), como de revertirlos si el tratamiento farmacológico se realizaba 8 h después de la exposición a la IMO.

Datos recientes obtenidos en nuestro laboratorio muestran que animales expuestos a la IMO también presentan déficits en la tarea de set-shifting. Esta prueba es una tarea operante compleja que valora la capacidad de cambio de estrategia de los animales para obtener un refuerzo. Si se ha enseñado a los animales a escoger la palanca activa según la posición de la misma (derecha o izquierda) para obtener el refuerzo, en la prueba de set-shifting hay un cambio de contingencias y la palanca que suministra el refuerzo viene ahora señalizada por otro estímulo (por ejemplo una luz situada encima de la palanca). Los animales tienen por lo tanto que cambiar la estrategia de elección de la palanca. La exposición a 2 h de IMO una semana antes de la prueba estaría produciendo un empeoramiento de la flexibilidad, reflejada en un aumento de los errores y de los ensayos necesario para adquirir la nueva tarea (Garrido et al, datos no publicado).

La IMO, como los anteriores modelos comentados, es capaz de inducir síntomas a largo plazo relacionados con la ansiedad, la memoria declarativa o las memorias de miedo. Estas alteraciones podrían asemejarse a las alteraciones que se observan en los pacientes con PTSD. Sin embargo, hay un aspecto fundamental aún no resuelto, la aparición de conductas de evitación hacia los estímulos relacionados con la experiencia traumática. Hasta el momento, no disponemos de resultados positivos que muestren que la IMO es capaz de inducir efectos condicionados.

4. CONDICIONAMIENTO CLÁSICO

4.1 DEFINICIÓN

El paradigma de condicionamiento clásico estudiado inicialmente por Ivan P. Pavlov (1927, crf en Bouton, 2007) se enmarca dentro de los llamados aprendizajes asociativos. Por definición, este tipo de aprendizaje requiere de la asociación entre dos o más acontecimientos, en concreto entre un estímulo que se denomina incondicionado (US) que por si solo provoca una respuesta incondicionada (UR), con un estímulo inicialmente neutro (NS), el cual no provoca inicialmente dicha respuesta. Después de una o múltiples asociaciones (US-NS), el estímulo inicialmente neutro se convertirá en un estímulo condicionado (CS), de tal manera que su sola presentación (sin la presencia del US) será capaz de provocar una respuesta, que se denomina condicionada (CR). Se considera que como consecuencia de la asociación, el CS ha adquirido un valor predictivo de la presentación del US.

Los primeros trabajos sobre el paradigma del condicionamiento clásico se basaron en US apetitivos y se condicionaba una respuesta vegetativa (Pavlov, 1927 crf en Bouton, 2007; Domjan, 2006). No obstante, otros investigadores también utilizaron US aversivos (Bechterev, 1913 crf en Bouton, 2007; Domjan, 2006). En este contexto, Watson y Rayner (1920 crf en Bouton, 2007) mostraron como habían inducido en Albert, un niño de aproximadamente 1 año de edad, miedo condicionado a una rata blanca (caso conocido como "Little Albert"). En este caso se asociaba la aparición de la rata blanca (NS) con un sonido muy fuerte producido por una barra de metal (US). Después de unos pocos emparejamientos Albert empezó a mostrar miedo cada vez que se le mostraba la rata (CS). Habían conseguido condicionar la respuesta de miedo, y además observaron cómo Albert generalizaba el miedo a otros objetos de pelo blanco. Estos estudios conformaron la base de un modelo que permitía estudiar cómo se adquieren y mantienen los miedos y las fobias.

4.2. CARACTERÍSTICA DE LOS ESTÍMULOS: CS Y US

Un elevado número de variables pueden afectar al grado de aprendizaje del condicionamiento clásico. A continuación se realizará una revisión de aque-

llas más importantes para la obtención de una correcta asociación CS-US (para revisión ver Bouton, 2007; Domjan, 2006)

El condicionamiento será más eficaz si tanto el CS como el US son nuevos para el sujeto. La exposición a los estímulos antes del emparejamiento puede tener diferentes efectos sobre el aprendizaje final. La exposición previa al CS induce habitualmente lo que se denomina inhibición latente, la cual reduce en general de manera significativa la tasa de aprendizaje. Se considera que la exposición previa al CS sin ninguna contingencia asociada produce una disminución de la atención hacia el estímulo (por un simple proceso de habituación) y dificulta la asociación posterior por la pérdida de valor predictivo del CS. La pre-exposición al US también produce un empeoramiento del condicionamiento, ya que su repetición también puede producir habituación a algunos de los efectos del US necesarios para un óptimo condicionamiento.

La relevancia de la asociación entre CS-US es un factor importante en los estudios de condicionamiento clásico. García y Koelling (1966) llevaron a cabo un experimento en el que observaron que la fuerza asociativa de un mismo CS variaba en función del US al que se asociaba. Observaron que el uso de una clave audiovisual (CS1) producía una CR mayor cuando se asociaba con un choque eléctrico (US), que el uso de un sabor (CS2). Contrariamente, el mismo sabor (CS2) era capaz de producir más CR que la clave audiovisual (CS1) cuando el US utilizado era un estado de malestar inducido por la administración de LiCl. De estos resultados se dedujo que la rapidez y la eficacia de un aprendizaje dependían, entre otras cosas, de la elección de un CS apropiado para el US utilizado. Las observaciones de García y Koelling propiciaron la aparición del concepto de asociación biológicamente preparada o "preparedness" (Seligman, 1971). Este concepto indica que las relaciones entre estímulos difieren y estando biológicamente preparadas para establecer alguna de ellas con más facilidad. Por ejemplo, claves visuales y comida para las palomas, o gustos y malestar para los mamíferos (aversión al gusto).

Los elementos temporales son un factor crítico para el desarrollo del condicionamiento clásico, ya que este tipo de aprendizaje es muy sensible a la relación temporal entre el CS y el US. Como norma general, la presentación del CS debe preceder a la presentación del US, sin embargo, existen diferentes métodos de presentación de ambos estímulos que pueden también ser efectivos. Por ejemplo, el condicionamiento de demora, método muy extendido para el estudio del condicionamiento clásico, donde el US se presenta después

de iniciado el CS y co-terminan ambos al mismo tiempo. El condicionamiento de traza se caracteriza por presentar el CS y el US con un intervalo entre la finalización del CS y el inicio del US. En este caso, la magnitud del intervalo determinará el grado de condicionamiento, dificultándolo más cuanto más alejados estén en el tiempo el CS y el US. También se pueden presentar los dos estímulos juntos, procedimiento denominado condicionamiento simultáneo. Tradicionalmente se ha relacionado este procedimiento con un menor grado de condicionamiento si se comparaba con los dos métodos anteriores. Finalmente, el condicionamiento hacia atrás, que consiste en la presentación del CS justo después de la finalización del US, muestra índices muy bajos de condicionamiento por lo que en muchos estudios se utiliza como grupo control o de pseudocondicionamiento. No obstante, se ha descrito que este tipo de aprendizaje no estaría señalizando la ocurrencia del US sino el período libre de US o safety signal. Por otro lado, el tiempo entre ensayos, es decir, el Intervalo entre Ensayo (ITI) es de gran importancia: a igualdad de número de ensayos, los ITI más largos (spaced-trials) dan lugar a mayor tasa de condicionamiento que los intervalos cortos (massed-trials (Fanselow y Tighe, 1988).

La relación existente entre la intensidad del US y el grado de aprendizaje es positiva: a mayor US, más elevada es la asíntota del aprendizaje. Sin embargo, respecto al CS, esta relación no está tan clara. A nivel teórico no es tan importante la intensidad como la relevancia (saliencia) del CS, es decir, que una luz más brillante o un sonido alto no son mejores por su intensidad sino por su relevancia respecto al contexto. Los CS de intensidades muy elevadas no son utilizados generalmente ya que por si mismos pueden producir algún tipo de respuesta. En estos casos se suele hacer una exposición previa al CS que pueda inducir habituación sin llegar a generar inhibición latente.

La sola presentación apareada de los estímulos no resulta en un buen aprendizaje. Es necesario que el CS obtenga un valor predictivo respecto a la aparición del US. Podemos encontrar contingencia positiva (CS+), donde el CS predice la aparición del US; contingencia negativa (CS-), donde la aparición del CS predice la no aparición del US, y por último contingencia cero (pseudocondicionado), en la que el CS no predice nada porque se presenta de forma aleatoria. La diferencia fundamental del último caso con los otros es que no se produce ningún tipo de aprendizaje asociado al CS.

4.3. FENÓMENOS ASOCIADOS

Efecto de Bloqueo

El efecto de bloqueo aparece cuando en una primera fase se asocia un CS1 y un US. Cuando se ha aprendido que el CS1 predice la aparición del US, se inicia una segunda fase dónde se introduce un segundo CS (CS2) que conjuntamente con el CS1 (CS1+CS2) se aparean con el US. Como resultado no aparece ninguna CR delante del CS2, probablemente porque el CS1 predice perfectamente la aparición del US y el CS2 no tiene ningún valor predictivo adicional (Kamin, 1969 crf en Bouton, 2007). Este efecto demuestra que el simple emparejamiento de dos estímulos no es suficiente para la aparición de condicionamiento.

Pseudocondicionamiento

El pseudocondicionamiento puede aparecer de dos maneras distintas. La primera cuando el CS por si mismo produce una respuesta determinada, que coincide con la CR que se va a medir posteriormente. Por ejemplo, si quieres condicionar el reflejo de parpadeo utilizando una luz como CS, se va a obtener una respuesta de parpadeo que se induce sólo con la presentación del CS. La segunda es cuando el US por si mismo puede modificar una futura respuesta, normalmente como consecuencia de su intensidad. Así, la repetición del US produce un aumento no específico de la respuesta a cualquier estímulo, por lo que parte del aumento de la respuesta al CS no es debida al condicionamiento sino a una sensibilización producida por la presentación previa del US.

Para evitar este tipo de interferencias hace falta seguir una metodología que permita identificar el origen de la respuesta y cerciorarse de que la respuesta medida es realmente consecuencia del condicionamiento. Para ello se requiere la introducción de determinados grupos, como por ejemplo, un grupo control expuesto únicamente al US sin la presencia del CS o un grupo expuesto de forma aleatoria al CS y al US (contingencia cero). De este modo, cuando expongamos al sujeto al CS, podremos descartar de manera clara si hemos causado algún tipo de pseudocondicionamiento o sensibilización. Esta problemática puede resultar crítica cuando el estímulo que se utiliza como US es un estímulo estresante, como ocurre en miedo condicionado (ver apartado 8.Sensibilización)

4.4. MECANISMOS DEL CONDICIONAMIENTO CLÁSICO: ¿CÓMO SE LOGRA LA ASOCIACIÓN?

Desde el inicio Pavlov describió el aprendizaje como una asociación entre estímulos (CS-US Stimulus Substitution Theory). Esta idea fue recogida años más tarde por Robert Rescorla (1975 crf en Bouton, 2007), quien mediante experimentos de comportamiento operante y de devaluación del US demostró esta asociación estímulo-estímulo. En los estudios de Rescorla, animales que no tienen acceso libre a la comida son entrenados para realizar una determinada tarea para conseguirla. En este caso la comida es el US. Cuando se les ofrece acceso libre a la comida (devaluación del US), la tasa de respuesta de los animales disminuye, mostrando que la asociación no es estímulo (CS) - respuesta (CR) sino estímulo (CS) - estímulo (US).

Durante la década de los 70, Robert Rescorla y Allan Wagner (1972 crf en Bouton, 2007) propusieron el primer modelo matemático para el estudio del aprendizaje mediante condicionamiento clásico. El modelo se sustentaba básicamente en la naturaleza sorpresiva del US y ha sido utilizado durante décadas como base para el estudio del condicionamiento y sus fenómenos asociados. Este modelo propone que el aprendizaje aparece por la discrepancia entre lo que se espera que ocurra y lo que realmente ocurre. Pone de manifiesto la importancia de que el US sea inesperado. Muestra cómo la curva de aprendizaje se ajusta a una función asintótica, y cómo la modulación de los parámetros de esta función predice la fuerza asociativa final de un condicionamiento, siendo la fuerza asociativa al grado de CR que se obtiene con la presencia del CS

Estos autores propusieron que el rápido aumento de la fuerza asociativa que se observa al inicio del condicionamiento va en relación a cuán sorprendente es la aparición del US. A medida que se suceden apareamientos CS-US, es decir, que el CS adquiere valor predictivo, la fuerza asociativa llega al límite superior de la función o asíntota. Este modelo predice los cambios que pueden observarse en la función de aprendizaje cuando modificamos algunos de los parámetros de los estímulos, tanto CS como US. Así, si aumentamos la magnitud del US, el límite superior de la curva (la asíntota) aumenta, obteniendo potencialmente una mayor fuerza asociativa (v). En cambio, si aumentamos la relevancia del CS, se produce un aumento en la velocidad de

llegada a la asíntota.

Este modelo también enfatizó la importancia del contexto en la asociación CS-US, remarcando que esta asociación siempre ocurre en un contexto determinado, y debido a esto, el sujeto aprende dos asociaciones: entre el CS y el US y entre el contexto y el US.

5. UN CASO DE CONDICIONAMIENTO CLÁSICO: MIEDO CONDICIONADO

5.1. MIEDO VS ANSIEDAD

El miedo y la ansiedad han sido consideradas como emociones similares por pertenecer a la misma esfera afectiva. Aunque algunos de los síntomas pueden resultar similares difieren en algunos aspectos clave (Lang et al, 2000; Davis et al, 2010; LeDoux, 2013). La aparición del miedo viene provocada por la presencia de un estímulo discreto que suele representar una amenaza real. Tiene carácter adaptativo, debido a que promueve la aparición de conductas defensivas, y se caracteriza por una aparición y disipación rápida, que suele coincidir con la presentación y retirada del estímulo respectivamente. Por otro lado, la ansiedad aparece delante de estímulos más difusos o menos predecibles que los que inducen miedo. Es considerada una emoción relacionada con la anticipación de la posible aparición de una situación o estímulo aversivo. Por esta falta de concreción en cuanto al estímulo que la provoca y el tiempo de duración, se caracteriza por ser un estado que puede mantenerse en el tiempo, pudiendo incluso volverse patológica. Sin embargo, cabe destacar que la respuesta de miedo también puede convertirse en patológica, por ejemplo en forma de fobia.

La diferenciación entre miedo y ansiedad viene apoyada por los estudios relacionados con el desarrollo de conductas defensivas en roedores. Tanto la presencia de un estímulo real como la de un estímulo potencialmente peligroso desencadenan conductas defensivas. Sin embargo, hay diversos tipos de conductas defensivas y no todas son sinónimo de miedo, sino que también pueden representar ansiedad (para revisión ver McNaughton y Corr, 2004). La clasificación sistemática de estos dos tipos de conducta defensiva (miedo y ansiedad) vino de la mano de los estudios del laboratorio de los Blanchard

(Blanchard et al, 1990), que realizaron una clasificación de los patrones de comportamiento en función de si el peligro era real o potencial. La conducta de miedo es provocada por la presencia de un peligro real (v.g. depredador), y el repertorio de conductas que muestran los animales suele consistir en la huida, la petrificación, o incluso el ataque, dependiendo de la distancia respecto al depredador. Aunque la primera conducta observada es la de huida, cuando no existe posibilidad de escape por la cercanía del depredador, la respuesta de petrificación se convierte en la conducta predominante. Si el animal es atacado por el depredador se desencadena conducta agresiva de tipo defensivo (v.g. ataque). Por otro lado, cuando los animales son expuestos a una señal de peligro potencial (v.g. olor al depredador) el patrón de conductas es totalmente diferente, mostrando conducta de evitación y huida combinadas con conductas de aproximación. Este repertorio lo asociaron a conducta ansiosa. La administración de ansiolíticos modificaban sólo las conductas consideradas ansiosas, en tanto que no tenían efecto alguno sobre la conducta de los animales frente a un peligro real (Blanchard et al, 1993).

Para el estudio del miedo y la ansiedad en un contexto experimental (tanto en ratas como en humanos) el grupo de Davis ha propuesto una diferenciación entre “miedo fásico” y “miedo sostenido” (Davis et al, 2010), considerando el primero como la respuesta defensiva de miedo y el segundo el estado ansioso. Para el estudio del “miedo fásico” suele utilizarse el condicionamiento a una clave. Sin embargo, desencadenar un estado de ansiedad siempre es más problemático. Tanto en roedores como en humanos, la administración de un choque sin señalizar (condicionamiento de miedo al contexto) o no predecible (CS-US no contingente) se ha usado como un modelo de “miedo sostenido”, ya que la relación entre el contexto y no permite conocer exactamente cuándo aparecerá el estímulo aversivo. Cabe destacar que, tanto en humanos como en roedores, las respuestas de “miedo sostenido” son más sensibles a los ansiolíticos (para revisión ver Davis et al, 2010). Además, se ha sugerido que las conductas defensivas observadas en roedores (huida, petrificación y valoración del riesgo entre otras) podrían ser análogas a las observadas en humanos (Blanchard et al, 2001).

5.2. CONDICIONAMIENTO DEL MIEDO: CONTEXTO EXPERIMENTAL

El condicionamiento del miedo, tanto en humanos como en animales, ha sido ampliamente utilizado en el laboratorio para el estudio de la adquisición y mantenimiento de las memorias aversiva. Esta aproximación ha sido de gran utilidad para investigar psicopatologías relacionadas con la ansiedad, como por ejemplo el trastorno de ansiedad generalizada (Luyten et al, 2011) y de estrés post-traumático (PTSD) (Johansen et al, 2011).

El miedo condicionado es un tipo de aprendizaje que permite aprender que determinados ambientes o estímulos presentes en el ambiente pueden indicar la aparición de un estímulo aversivo para el organismo. Siguiendo las leyes del condicionamiento clásico, se establece una asociación entre un estímulo inicialmente neutro (NS, que puede ser una clave específica o un contexto) con un US aversivo (generalmente un choque eléctrico) que provoca una respuesta de miedo (Fanselow, 1990; Phillips y LeDoux, 1992; Davis et al, 1993; Maren et al, 1997). Como consecuencia de la presentación de estos estímulos conjuntamente y después de una o varias repeticiones, el NS se convierte en un CS que por si solo producirá una respuesta de miedo (sin necesidad de que el US esté presente). El condicionamiento del miedo utilizando el choque eléctrico es extraordinariamente duradero, pudiéndose observar RC a los 30 días (Pickens et al, 2009) e incluso a los 6 meses tras la última exposición al choque eléctrico (Lehmann et al, 2007).

Tradicionalmente el choque eléctrico ha sido el US aversivo más utilizado en el estudio con animales de experimentación pero también otros tipos de estímulos se han mostrado eficaces en el establecimiento de condicionamiento clásico. Por ejemplo, el olor a depredador (Dielenberg, 2001) que induce por si mismo (del mismo modo que el choque eléctrico) un condicionamiento al contexto dónde se ha presentado. Otros estímulos como la natación forzada (Land et al, 2008) o la inmovilización en tubo (Murua y Molina, 1990) se han utilizado asociadas a una clave olfativa (CS), valorando posteriormente el condicionamiento aversivo al olor aplicado en otros contextos. La administración intracerebral de sustancias que desencadenan parte de la respuesta al estrés, como por ejemplo el CRF (Sahuque et al, 2006; Land et al, 2008), o la administración periférica de sustancias que causan malestar visceral o náuseas como el LiCl (Parker y McDonald, 2000; Tenk et al, 2006) pueden ser

utilizados como US en un paradigma como el de condicionamiento aversivo a un lugar (CPA). En el CPA se utiliza un aparato que está formado por dos o tres compartimentos distinguibles entre si por sus características físicas (tanto visuales como táctiles, e incluso en algunos casos olfativas). El día del condicionamiento se confina al animal en uno de ellos (CS) y se le administra la sustancia aversiva (US). Horas o días más tarde, se permite la exploración libre del aparato y se valora el tiempo de permanencia en cada compartimento, considerando la disminución del tiempo de estancia en el compartimento asociado a la sustancia aversiva como indicador de condicionamiento. Este efecto de aversión por un lugar se ha observado también cuando se han provocado, mediante administración de naloxona, estados de abstinencia en animales dependientes de opiáceos (Stinus et al, 2000; Azar et al, 2003).

Además de la variedad de US utilizados, el condicionamiento del miedo se puede clasificar en dos subtipos, atendiendo al tipo de CS que se utiliza durante el procedimiento:

☒ Condicionamiento de miedo al contexto: es el procedimiento más simple dentro del paradigma de miedo condicionado. La característica principal es que el CS utilizado es el propio contexto donde el animal experimenta el estímulo aversivo.

☒ Condicionamiento de miedo a una clave explícita: Los CS utilizados son estímulos más específicos, como por ejemplo un tono, una luz o un olor, que adquieren una relevancia superior dentro del contexto, que en este tipo de condicionamiento pasa a un segundo plano.

Se considera, que en el primer caso el contexto está en el foreground y en el segundo caso está en el background. Cuando se presenta un CS explícito, éste suele enmascarar al contexto, fenómeno conocido como overshadowing o ensombrecimiento, provocando una disminución de la CR delante del contexto (Maren et al, 1994).

FIGURA 2: ESQUEMA GENERAL DEL CONDICIONAMIENTO DEL MIEDO.



5.2.1. MEDIDAS DE LA RESPUESTA DE MIEDO CONDICIONADA

Como consecuencia de la adquisición del miedo condicionado a un contexto o a una clave específica, cuando los animales son expuestos de nuevo al CS muestran una respuesta que se considera de miedo. Pero, ¿cómo podemos medir en modelos animales esta respuesta de miedo condicionada?

MEDIDAS CONDUCTUALES

Uno de los primeros métodos usados para valorar el miedo condicionado fue la respuesta emocional condicionada (CER). Los animales eran entrenados en un paradigma de condicionamiento operante, para realizar una determinada tarea con el objeto de obtener un refuerzo, que generalmente era comida. Cuando los animales realizaban esta acción de manera satisfactoria, se les sometía a una sesión de adquisición de miedo condicionado (normalmente con el choque eléctrico como US), en la que habitualmente se utilizan estímulos auditivos (tono) o visuales (luz) como CS. Dicha asociación podía realizarse en el mismo contexto operante o en otro distinto. Una vez los animales habían adquirido este condicionamiento del miedo eran expuestos de nuevo a la situación donde realizan la tarea operante. Todos aquellos animales que habían adquirido el condicionamiento mostraban supresión de la conducta operante frente a la presentación del CS (Heth, 1976; Bouton y Bolles, 1980; Norman y Cassaday, 2004). Si el estímulo aversivo no era apareado con anterioridad (grupo desapareado) o si sólo se había presentado el tono sin ningún US asociado, la CER o supresión de la conducta operante no aparecía. Las primeras interpretaciones consideraban la supresión de la conducta operante como una competición entre la conducta activa que representaba la conducta operante y la reacción innata del animal a realizar conductas defensivas como la petrificación. Esta interpretación ha ido evolucionando y, actualmente, la interpretación de la supresión de la conducta se relaciona con la devaluación del refuerzo, consecuencia de la asociación de este con un estímulo aversivo (Everitt et al, 2003).

Otro método utilizado para valorar el miedo condicionado es la evitación pasiva. Este procedimiento se realiza en un aparato con dos compartimentos, uno abierto, blanco e iluminado y otro negro, tapado y no iluminado. Cuando la rata o el ratón es inicialmente expuesto al compartimento iluminado, su tendencia natural es ir hacia el protegido, en el momento que ocurre la transición hacia el compartimento protegido, se cierra la puerta de comunicación entre ambos y se le administra un choque eléctrico. Horas o días más tarde los animales son expuestos de nuevo al test, introduciéndolos en el compartimento iluminado. El resultado de la asociación entre el contexto y el choque eléctrico es un aumento de la latencia de entrada en el compartimento protegido, y ésta se considera una medida directa de miedo condicionado (Roozendaal et al, 1993; Kiernan et al, 1995; Medina et al, 1999).

También se ha utilizado la prueba de la evitación activa de dos sentidos para la medida indirecta de la respuesta de miedo. La evitación activa consiste en asociar una clave específica (CS) que señala la aparición de un choque eléctrico (US) para así poder evitarlo mediante la realización de una tarea instrumental. Puede considerarse que este aprendizaje se divide en dos partes. Una primera en que el animal debe asociar el CS con el US, que sería un condicionamiento Pavloviano. En una segunda parte, el sujeto aprende a realizar la tarea instrumental (cambiar de compartimiento) para evitar el choque eléctrico. De este modo, el miedo que genera el CS aumenta la motivación para aprender la respuesta instrumental (Choi et al, 2010). Sin embargo, la influencia de los niveles de ansiedad de los animales en la ejecución de la prueba ha sido observada en diversos estudios. Existen cepas de ratas llamadas Romanas high and low-avoidance (RHA vs RLA respectivamente), que han sido seleccionadas genéticamente en función de su nivel de ejecución en la prueba de evitación activa de dos sentidos, obteniendo dos poblaciones muy diferenciadas: las que aprenden a realizar la tarea de una manera rápida (RHA), y las que lo hacen de manera lenta (RLA). Un gran número de estudios han mostrado que las RLA son más ansiosas que las RHA en diferentes pruebas de ansiedad (Ferré et al, 1995; Escorihuela et al, 1999). En ratas genéticamente heterogéneas, existe una correlación negativa entre la ansiedad basal (no adquirida) y la ejecución de la prueba, de tal manera que aquellos animales que muestran más conductas ansiosas valoradas en pruebas como el laberinto circular presentan tasas más bajas de evitación en la prueba de evitación activa (Lopez-Aumatell et al, 2009; Vicens-Costa et al, 2011). Todos estos datos ponen de manifiesto la correlación que existe entre la ejecución de esta prueba y los niveles de ansiedad.

Posteriormente se utilizaron otras medidas para evaluar las respuestas de miedo, siendo la más utilizada la conducta de petrificación o freezing. Como hemos comentado anteriormente, existen respuestas activas de miedo, pero, la respuesta de freezing es una respuesta pasiva. Cuando activamos en un animal la respuesta de miedo, éste responde con un repertorio limitado de respuestas. Estas conductas se denominan Species-specific defensive reactions (SSDRs) (Fanselow, 1984), y la SSDR más dominante tanto en rata como en ratón es la conducta de petrificación o freezing (Blanchard y Blanchard, 1969). Esta conducta se caracteriza por la ausencia total de movimientos del animal exceptuando los relacionados con la respiración. Simultáneamente, también se pueden observar algunas características adicionales como la pos-

tura corporal de crouching o piloerección (Masuda et al, 1999). Tanto el crouching como la piloerección son usadas en muchos casos para corroborar si el animal observado está realizando una conducta de freezing. Aquellos animales que han sido sometidos a choque eléctrico (Bolles y Collier, 1976) o a la exposición al olor del depredador (Blanchard et al, 2003a) en un contexto determinado muestran un aumento de la respuesta de freezing cuando son expuestos de nuevo a ese mismo contexto y no a otro distinto, indicando que esta conducta es en respuesta a las claves asociadas al choque eléctrico. No obstante, cabe destacar que también podemos encontrar aumento de los niveles de freezing en otros contextos debidos al fenómeno de la generalización (Baldi et al, 2004), como será comentado posteriormente.

Existen distintos métodos para valorar la conducta de freezing. De manera tradicional se ha medido manualmente, bien analizando toda la conducta de freezing observada a lo largo de todo el período que dura el test experimental, (Phillips and LeDoux, 1992), o realizando medidas conductuales cada cierto período de tiempo (Maren et al, 1997). Además la conducta de freezing también ha sido evaluada mediante infrarrojos (para detectar movimiento) (Lee y Kim ,1998), con programas de análisis de movimiento (video-tracking software) (Laurent-Demir y Jaffard, 2000), con programas que mediante el análisis de una imagen de video comparan la posición de los píxel entre un segundo y otro de la grabación (Richmond et al, 1998) o mediante células fotoeléctricas que detectan el desplazamiento del animal (Maren et al, 1998; Van de Weerd et al, 2001). La aproximación automatizada de la medida de la conducta de freezing supuso un gran avance, ya que eliminaba la subjetividad y el efecto de la fatiga por parte del observador, a la vez que hacía desaparecer las diferencias entre observadores. Sin embargo, las medidas automáticas pueden llegar a ser poco fiables en algunos casos. Por ejemplo, la respiración espasmódica durante el freezing puede confundirse con actividad, o la inactividad por aburrimiento/sueño de un animal, consecuencia de la exposición prolongada a la prueba, puede confundirse con freezing. Los métodos automatizados suelen ser más precisos cuando se trabaja con ratones. Además de presentar niveles de actividad más elevados que la rata, el tamaño de las cajas en proporción al tamaño de los animales suele ser mucho más grande disminuyendo la probabilidad de inactividad. Por el contrario, las cajas de condicionamiento utilizadas en ratas no son mucho más grandes que las utilizadas

para ratón y la inmovilidad se ve favorecida, siendo una conducta fácilmente confundible con el freezing cuando se analiza automáticamente.

Aunque el freezing ha sido la CR más utilizada de forma tradicional, no deberíamos descartar la hipo-actividad como medida alternativa. Se ha descrito que cuando se evalúan niveles bajos de miedo condicionado, la conducta predominante puede no ser el freezing sino una reducción de la actividad, mientras que cuando la intensidad del miedo aumenta, el freezing vuelve a ser de nuevo la conducta predominante (Laxmi et al, 2003). Además existen muchas diferencias individuales en la expresión del miedo condicionado, habiéndose descrito por ejemplo, que en algunas cepas de ratones predomina el freezing como respuesta de miedo y en otras la hipo-actividad (Stiedl et al, 1999).

También se ha utilizado para medir el miedo condicionado la prueba denominada Fear-Potentiated Startle (Davis, 1986; 2001). Esta prueba parte de la medida del reflejo de sobresalto acústico (Acoustic Startle reflex, ASR). La ASR mide la amplitud de la respuesta de sobresalto provocada por la presentación de un estímulo acústico intenso e inesperado. Sin embargo, a diferencia de la medida estándar del reflejo de sobresalto, en el fear-potentiated-startle, se debe condicionar previamente un estímulo que actúa como CS (tono, luz o soplo de aire) a un US (choque eléctrico). Cuando los animales previamente condicionados son expuestos a la prueba del ASR, la presencia del CS provoca un aumento de la respuesta de sobresalto, respecto a los ensayos en ausencia del CS, y este aumento no se observa en los animales que no han sido condicionados (Davis, 1986, Falls y Davis, 1994). Por lo tanto, el miedo condicionado es definido como el aumento o potenciación de la amplitud de la ASR en presencia del CS. Se debe tener en cuenta que el CS no induce per se reflejo de sobresalto y que el estímulo auditivo que induce sobresalto nunca ha sido apareado directamente con un estímulo aversivo (US). El diseño permite además tener un control intra-sujeto de la medida, ya que podemos valorar la amplitud de la respuesta sin y con el CS en el mismo sujeto. Asimismo nos permite diferenciar los efectos condicionados de la sensibilización, comparando la respuesta de los animales condicionados con los animales no condicionados, en ausencia del CS (Davis, 2001). La capacidad de esta prueba para proporcionar tantos controles internos la convierte en una prueba muy válida para el estudio del condicionamiento del miedo. Además, se ha observado

que esta medida correlaciona muy bien con los niveles de freezing (Davis, 1986).

MEDIDAS FISIOLÓGICAS

Desde el punto de vista fisiológico también se ha valorado la CR de miedo, especialmente mediante cambios en presión arterial, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y vocalizaciones ultrasónicas.

La presión arterial se ha descrito como una respuesta muy sensible a la presentación del CS y que responde de manera bifásica, aumentando en los primeros segundos de presentación del CS, para luego experimentar un descenso hasta volver a recuperar su nivel basal (Iwata y LeDoux, 1988). Cuando el CS es el contexto esta respuesta bifásica también se observa pero más prolongada en el tiempo (Carrive, 2000; 2006). Los animales pseudocondicionados también muestran una elevación de la presión arterial aunque mucho menor en magnitud, lo que permite separar claramente la respuesta no asociativa (sensibilización) de la asociativa (Iwata y LeDoux, 1988).

La frecuencia cardíaca también presenta un patrón de respuesta bifásico delante del CS, observándose taquicardia seguida de bradicardia (Iwata y LeDoux, 1988). No obstante, encontramos también resultados contradictorios, habiéndose observado tanto aumentos (Antoniadis y McDonald, 1999; Walker y Carrive, 2003) como disminuciones de la frecuencia cardíaca (Nijsen et al, 1998; Carrive, 2000). Para poder explicar los hallazgos de datos contradictorios, incluso en los mismos autores, es necesario la comparación de la frecuencia cardíaca durante dos exposiciones consecutivas (días separados) al contexto condicionado. Este análisis pone de manifiesto la existencia de una correlación negativa entre los niveles de freezing y la frecuencia cardíaca. Es decir, cuando la intensidad del miedo es muy elevada y los niveles de freezing también lo son, la ausencia de movimientos propicia la disminución de la frecuencia cardíaca. Cuando los niveles de freezing van disminuyendo como consecuencia de la extinción del miedo, la actividad del animal aumenta y con ella su frecuencia cardíaca (Carrive, 2000). Además, se ha descrito que esta respuesta podría ser dependiente del contexto, es decir, cuando el CS (en este caso, una clave específica) es presentado en un contexto diferente al utilizado para el condicionamiento, la bradicardia observada es menor, hasta el

punto de no mostrar diferencias con los pseudocondicionados (Iwata y Le-roux, 1988).

La frecuencia respiratoria como respuesta de miedo condicionada se caracteriza por una disminución de la misma delante de la presentación del CS. Esta respuesta condicionada se ha observado tanto con el uso del choque eléctrico (Hegoburu et al, 2011) como con la presentación de CO₂ como US (Nsegbe et al, 1997). Esta disminución de la frecuencia respiratoria tras la presentación del CS se ha mostrado sensible además a la intensidad del choque, con una mayor disminución de la frecuencia respiratoria delante del CS cuanto más elevada es la intensidad del US administrado el día de la adquisición (Hegoburu et al, 2011).

Por último, cabe destacar la medida de las vocalizaciones ultrasónicas. Está bien establecido que las vocalizaciones comprendidas entre 22-35 kHz representan señales de alarma, caracterizadas por ser llamadas prolongadas y emitidas por los animales en situaciones estresantes. Por el contrario, las vocalizaciones comprendidas entre los 35-72 kHz se han relacionado con estados apetitivos y suelen ser emitidas en un patrón de llamadas cortas (Brudzynski, 2005). En algunos estudios, las vocalizaciones relacionadas con estados aversivos (22 kHz) parecen sensibles a la intensidad del US el día de la adquisición (más vocalizaciones ultrasónicas cuanto más intenso es el US administrado), sin embargo estas diferencias desaparecen el día del test (cuando sólo se presenta el CS) (Wöhr et al, 2005; Hegoburu et al, 2011). Sin embargo, en estos trabajos no se ha incorporado un grupo no condicionado o expuesto a otro CS, por lo que no se puede garantizar la especificidad de la respuesta. No obstante, otros estudios sí muestran un aumento de las vocalizaciones asociado a la exposición al contexto condicionado y no a otro distinto (Antoniadis y McDonald, 1999; Frystak y Neafsey, 1991), resultados que apoyarían la posibilidad de usar las vocalizaciones ultrasónicas como medida de condicionamiento.

5.2.2. MIEDO CONDICIONADO Y RESPUESTA DEL EJE HPA

La exposición a un estímulo estresante, como por ejemplo el choque eléctrico, puede inducir a largo plazo un incremento de la respuesta del eje HPA que puede observarse tanto frente al contexto donde se ha experimentado el estrés

(como muestra del condicionamiento generado) como en otros contextos (sensibilización y/o generalización). Diversos estudios con choque eléctrico han evaluado la respuesta del eje HPA frente al contexto condicionado, observándose una mayor respuesta en aquellos animales que habían sido previamente condicionados (Van de Kar et al, 1991; Goldstein et al, 1994; Campeau et al, 1997; Cordero et al, 1998; Merino et al, 2000). El estudio realizado por Merino y colaboradores (2000), muestra una relación entre la intensidad del US y la respuesta del eje HPA durante la re-exposición al contexto condicionado: a mayor intensidad del US mayor respuesta de la corticosterona al contexto condicionado. Sin embargo, ninguno de los estudios anteriormente mencionados han intentado distinguir entre la respuesta hormonal que estaría reflejando condicionamiento y la posible sensibilización hormonal causada por la simple exposición a un estímulo estresante (v.g. sensibilización). Este matiz es de gran importancia cuando es necesario establecer relaciones de causalidad entre exposición al estrés y los efectos a largo plazo. Para poder diferenciar las dos respuestas se precisa estudiar la respuesta endocrina a otros contextos y la respuesta de un grupo experimental expuesto al estímulo aversivo pero no condicionado.

Estudios de nuestro laboratorio utilizando la exposición al olor del depredador han mostrado que la respuesta hormonal, tanto de la ACTH como de la corticosterona, sí parece sensible al condicionamiento. Aquellos animales expuestos al olor en un contexto determinado presentaban, 7 días más tarde, una respuesta hormonal mayor delante de este contexto que los animales no expuestos al olor (Muñoz-Abellán et al, 2009; 2010). Esta respuesta aumentada era evidente tanto si se comparaba con el grupo no expuesto (control) como con la respuesta de los mismos animales a otro contexto diferente al condicionado (v.g. EPM). Estos resultados indican que la mayor respuesta obtenida cuando los animales fueron expuestos de nuevo al contexto condicionado no era inespecífica, sino que representa una respuesta hormonal condicionada.

6. ADQUISICIÓN, CONSOLIDACIÓN Y EXTINCIÓN DEL MIEDO CONDICIONADO

Independientemente del tipo de condicionamiento del miedo (contextual versus clave explícita), podemos dividir este paradigma en tres fases muy diferenciadas, que a grandes rasgos son:

- 1) Adquisición: establecimiento de la asociación CS-US.
- 2) Consolidación: progresivo fortalecimiento de la memoria a largo plazo.
- 3) Extinción: la presentación repetida del CS sin la presentación del US conduce a una disminución progresiva de la CR.
- 4) Reconsolidación: modificación de la memoria

El condicionamiento del miedo es un paradigma muy extendido en el estudio de los procesos de adquisición y mantenimiento de memorias traumáticas. Una de sus principales ventajas es que es un aprendizaje que se puede adquirir, utilizando los parámetros correctos, con solo un emparejamiento CS-US (Fanselow, 1980; Rudy, 1993). Esto demuestra además que existe una gran predisposición por parte de los organismos a desarrollar este tipo de asociaciones. A continuación se detallaran los factores que pueden resultar críticos en cada etapa del condicionamiento y que consecuencias pueden tener la modulación de estos, con el objetivo de entender mejor que es y cómo funciona el condicionamiento del miedo.

6.1. ADQUISICIÓN

Como ya se ha comentado, desde el inicio de los estudios del miedo condicionado el US más utilizado ha sido el choque eléctrico en las patas. Uno de los motivos principales de su extensa utilización es la posibilidad de regular

con mucha precisión la intensidad y la duración del estímulo aversivo utilizado para la adquisición.

Según la teoría de Rescorla-Wagner, existen dos preceptos sobre la adquisición del condicionamiento que estarían afectando directamente a la magnitud del mismo. El primero indica que la intensidad de la CR es proporcional a la magnitud del US. El segundo es la capacidad del CS de predecir la aparición del US.

En relación a la intensidad del US, se observa una intensidad mínima por debajo de la cual no se consigue ningún tipo de CR, ni en respuesta a la exposición al contexto ni a la exposición a una clave específica. Tradicionalmente, se ha asumido que cuando la intensidad de choque va aumentando (Young y Fanselow, 1992; Cordero et al, 1998; Merino et al, 2000; Quinn et al, 2008), se traduce en un aumento del nivel de CR (freezing). Sin embargo, algunos estudios (Bevins et al, 1997; Baldi et al, 2004) han mostrado como el aumento de la intensidad del US no induce un aumento lineal de la CR. Un análisis más detallado de los distintos estudios nos permite observar que en aquellos trabajos donde observan diferencias entre intensidades utilizaron intensidades comprendidas entre los 0.2mA, 0.4mA y 1mA (Young y Fanselow, 1992; Cordero et al, 1998; Merino et al, 2000;). Por el contrario, los que no encontraron diferencias utilizaron intensidades que incluían 0.3mA, 0.6mA, 0.9mA y 1.2mA (Baldi et al, 2004). En este estudio, sólo la intensidad de 0.3mA mostró niveles de freezing distintos comparados con su intensidad inmediatamente superior. Otro estudio realizado por Bevins y colaboradores (1997) obtuvo resultados similares con el uso de 0.5mA y 1mA, observando los mismos niveles de CR (freezing) en ambas intensidades. El análisis de los diferentes trabajos pone de manifiesto la existencia de un efecto techo en intensidades medias-altas (alrededor de 0.6mA), a partir de la cual no se observan diferencias entre intensidades. El hallazgo de diferencias en el CR (freezing) dependerá del rango de intensidades utilizado. Dentro de los estudios sobre la intensidad del US, debemos diferenciar entre el condicionamiento al contexto y el condicionamiento a una clave específica. Aunque el efecto techo mencionado anteriormente es observado en ambos casos (clave específica y contexto), el umbral mínimo para el condicionamiento del miedo a una clave específica es mucho menor que el necesario para conseguir un condicionamiento al contexto (Baldi et al, 2004).

Asimismo, el número de emparejamientos CS-US y la magnitud de la CR guardan una relación positiva, pudiéndose observar un efecto techo de la CR que es dependiente de la variable medida (Quinn et al, 2008). No parece que la contribución del número de choques y su intensidad a la magnitud de la CR tenga carácter aditivo (Laxmi et al, 2003; Quinn et al, 2008) Datos obtenidos con el estudio de condicionamiento de miedo a un tono observan que, independientemente del número de choque administrados, los animales sometidos a intensidades elevadas de choque eléctrico muestran más CR (freezing), tanto delante del contexto como del CS específico (tono), que los animales sometidos a intensidades bajas de choque (Quinn et al, 2008).

La existencia de un umbral de intensidad menor para el condicionamiento de una clave que para el contexto está relacionada con la especificidad y proximidad temporal con la que se presenta la clave específica, que son mucho mayores que con el contexto. La especificidad del CS hace referencia al hecho de que las claves específicas (v.g. tono, luz) suelen representar sólo un estímulo relativamente simple de una modalidad sensorial particular, mientras que el contexto requiere estímulos complejos que pueden integrar más de una modalidad sensorial. Por otro lado, cuando hablamos de proximidad nos referimos a los parámetros de presentación temporal del CS-US, siendo más difícil la adquisición de un CS específico cuanto más alejados se presentan del US (Chowdhury et al, 2005).

Cuando se utiliza el contexto como CS, éste siempre está presente durante el condicionamiento y la importancia de la temporalidad de la presentación de los estímulos se ve sustituida por la importancia de la exploración del contexto, dificultándose el condicionamiento cuando la exploración previa del contexto es limitada o inexistente (Fanselow, 1990; Bevins y Ayres, 1995). No obstante, hay que tener en cuenta, que según las leyes clásicas del condicionamiento, la exposición previa muy prolongada al contexto o a una clave específica (CS) daría como resultado el fenómeno de inhibición latente, dificultando así el aprendizaje (Rudy, 1994; Radulovic et al, 1998b; McConnell et al, 2009). Sin embargo, este fenómeno no siempre es evidente. En ciertos estudios se lleva a cabo una breve exposición al CS en una fase previa de habituación sin que esto suponga un déficit de condicionamiento (Fanselow et al, 1993; Rudy y Pugh, 1996). Al contrario de lo que predice la inhibición latente, las exposiciones previas al condicionamiento al contexto al que se va a condicionar no sólo no disminuye el grado de condicionamiento sino que dismi-

nuye la generalización del miedo a otros ambientes distintos (Biedenkapp et al, 2007). Especialmente en el caso del condicionamiento de miedo al contexto, los factores que favorecen la aparición de inhibición latente o de una mejora del aprendizaje tras la exposición previa al contexto condicionado no han sido sistemáticamente estudiados, se desconocen los mecanismos que regulan cuál de los fenómenos predominará y su implicación en la formación de la memoria del contexto.

6.2. CONSOLIDACIÓN

En el momento en que se forma una memoria, ésta es lábil y vulnerable a intervenciones o interferencias de agentes externos o internos (memoria a corto plazo), pero con el paso del tiempo (horas), se va estabilizando (memoria a largo plazo) y es mucho menos sensible a las interferencias de los agentes anteriormente mencionados. Este proceso de estabilización progresiva de la memoria se denomina consolidación (Nader y Hardt, 2009). La evidencia empírica de la existencia de este proceso ha venido de la mano de estudios dónde se inducían amnesias retrógradas mediante electrochoques (ECS) (McGaugh, 1966). Estos estudios mostraban alteraciones en la expresión de la memoria cuando los animales eran expuestos a ECS justo después del aprendizaje, pero sobretudo observaban la existencia de una ventana temporal o ventana de consolidación en la que la memoria es lábil y modificable y el proceso de estabilización de la memoria se favorecía con el paso del tiempo (Nader y Hardt, 2009; McKenzie y Eichenbaum, 2011).

Tiendo en cuenta la existencia de esta ventana temporal que permite el fortalecimiento de la memoria, el intervalo de tiempo transcurrido ente la adquisición y la prueba de condicionamiento es un factor importante a tener en cuenta cuando queremos valorar la CR corto plazo. Observamos que a mayor distancia entre la adquisición y el test más CR encontramos (1 h versus 24 h) (Rudy y Matus-Amat, 2005). Sin embargo, esta variable temporal pierde relevancia cuando valoramos la CR a largo plazo. Generalmente, la CR suele mantenerse o disminuir con el paso del tiempo (Houston et al, 1999), aunque en algunos casos la realización de un sobre-entrenamiento puede inducir la aparición de un fenómeno de incubación del miedo condicionado (Pickens et al 2009), aunque no de manera consistente (Lehmann et al, 2007, Zelikowsky et al, 2012).

La exposición a una situación estresante inmediatamente después de la adquisición de un aprendizaje (dentro de la ventana de consolidación), especialmente tras aquellos aprendizajes que tienen un carga emocional, puede facilitar la consolidación del aprendizaje anterior (para revisión ver Schwabe et al, 2012). Del mismo modo, se ha observado que la administración de corticosterona puede producir efectos sobre la consolidación de la memoria de miedo si es administrada justo después de la adquisición (Hui et al, 2004; Cohen et al, 2008). Es importante remarcar que los efectos de la corticosterona son claramente dosis-dependientes, observando una potenciación de la consolidación de la memoria de miedo asociada al olor al depredador cuando se administra a dosis bajas y una disrupción del recuerdo cuando se administran dosis altas (Cohen et al, 2008)

6.3. EXTINCIÓN:

La extinción es una forma de aprendizaje que se caracteriza por una disminución de la amplitud y la frecuencia de la CR delante de la presentación de un CS. La presentación repetida del CS sin que sea seguido por el US, da lugar a una disminución de la CR (respuesta de miedo) como consecuencia de la pérdida de capacidad predictiva del CS. La extinción del miedo condicionado ha sido un modelo ampliamente estudiado por su implicación en el campo de la investigación en humanos, dada su importancia para el desarrollo de nuevas terapias aplicadas al tratamiento de memorias aversivas, muy relacionadas con el desarrollo y mantenimiento de los trastornos de ansiedad.

Desde el inicio del estudio de la extinción del miedo condicionado, el mecanismo por el cual las memorias aversivas disminuyen ha atraído la atención de los investigadores. Aunque no se puede asegurar que el mero paso del tiempo no produzca una disminución de la CR, este pequeño olvido no es suficiente para hacer desaparecer la CR, sino que es necesaria la presentación del CS sin la presencia del US para que la CR desaparezca. La posibilidad más sencilla y la primera que se barajó fue que la extinción era un borrado de la memoria anterior que era sustituido por el nuevo aprendizaje de que el CS no predice el US (Robbins, 1990). Sin embargo, está bien establecido que los efectos de la extinción no son permanentes provocando la recuperación de la CR por el simple paso del tiempo, sin ninguna intervención, fenómeno llamado recuperación espontánea (Rescorla, 2004). Otro fenómeno relacionado con la recuperación de la CR es la reanudación (Renewal). La extinción de un CS es contexto dependiente, de tal manera que si se presenta el CS en otro

contexto distinto al de la extinción, la CR reaparece (Bouton y King, 1983). Además de la existencia de estos dos fenómenos de recuperación de la respuesta, también se puede obtener la recuperación de la CR con la presentación de un US sin señalar, fenómeno denominado restauración o reinstatement (Westbrook et al, 2002). Todos los fenómenos mencionados anteriormente ponen de manifiesto que la relación entre CS-US no desaparece después de una procedimiento de extinción (la memoria no se borra) y por lo tanto se han tenido que desarrollar teorías alternativas (para revisión ver Myers y Davis, 2007).

La teoría del aprendizaje inhibitorio postula la formación de un nuevo aprendizaje inhibitorio opuesto al aprendizaje excitador establecido como consecuencia de la adquisición del miedo condicionado. Cuando un animal adquiere el condicionamiento de miedo está formando una asociación que tiene como consecuencia la puesta en marcha de una respuesta activa de miedo tras el CS. Cuando este animal es sometido a un protocolo de extinción, el animal adquiere una nueva asociación que es inhibitoria, es decir, la presentación del CS produce una inhibición de la respuesta que generaba la primera asociación. El mismo CS es capaz de generar pues un aprendizaje excitador y otro inhibitorio (Myers y Davis, 2002; 2007).

Hoy en día se asume que la extinción implica tanto mecanismos asociativos como no asociativos, pero la implicación y la forma en que interaccionan entre ellos aún no está del todo clara. Hay autores que apuntan que la importancia de cada uno de los mecanismos variará en función de la distancia temporal que hay entre la adquisición y la extinción. Se ha observado que si se somete al animal a un protocolo de extinción a las 24 h o 72 h posteriores a la adquisición, este mostrará una gran facilidad para la recuperación espontánea, la reanudación y la restauración. En cambio, si este protocolo de extinción se lleva a cabo dentro del período de 10 min a 1 h de la adquisición, todos los fenómenos anteriormente mencionados no aparecen (Myers et al, 2006). Se ha sugerido que estos efectos estarían relacionados con el hecho de que se está realizando la extinción dentro de la ventana temporal de la consolidación del primer aprendizaje. Además, el bloqueo de los canales de calcio responsables de la potenciación a largo plazo (LTP, proceso de plasticidad sináptica subyacente a un aprendizaje) bloquean sólo la extinción que se lleva a cabo entre 1 y 3 h post-adquisición pero no tiene ningún efecto sobre la extinción inmediata, poniendo de manifiesto mecanismos distintos en la ex-

tinción inmediata y la demorada (Cain et al, 2002; 2005). Los protocolos de extinción a corto plazo podrían estar produciendo un borrado de la memoria y por eso no se observan los fenómenos de recuperación que clásicamente se habían utilizado para justificar que la extinción se basaba en la formación de un nuevo aprendizaje inhibitorio.

Pero no todos los datos coinciden con la existencia de dos mecanismos de procesamiento. Un estudio realizado tanto en humanos como en ratas muestra que tanto si la extinción se realiza inmediatamente después de la adquisición, como si se hace 3 días más tarde, los fenómenos de recuperación de la respuesta aparecen en ambos grupos por igual. Asimismo observan que las ratas sometidas a la extinción inmediata muestran una tasa de disminución de la respuesta más elevada simplemente debido a que su curva de aprendizaje de la extinción es más rápida (Schiller et al, 2008). Los autores justifican las diferencias con los experimentos anteriores alegando que tanto las variables estudiadas para valorar la CR (freezing vs fear potentiated startle), como los CS utilizados (tono vs luz) eran distintos. Existen otros previos obtenidos en animales que muestran como una extinción llevada a cabo 1 h después de la adquisición no es capaz de bloquear la recuperación espontánea de la CR (Quirk, 2002).

6.4. RECONSOLIDACIÓN

Cuando una memoria ya está estabilizada, es decir, consolidada, podemos volver a reactivarla mediante la presentación de reminders o recordatorios (generalmente mediante la presentación del CS, pero también pueden ser el US). La presentación de un recordatorio tiene como consecuencia que la memoria que teníamos almacenada entre de nuevo en una fase lábil, empezando de nuevo un proceso de consolidación parecido al que se observa después de un aprendizaje nuevo. Este proceso recibe el nombre de reconsolidación (para revisión ver Nader et al, 2000; Nader, 2003). Durante esta fase donde la memoria vuelve a activarse puede sufrir modificaciones, tanto para fortalecerla como para debilitarla antes de que vuelva a ser almacenada. El papel biológico de la reconsolidación es proporcionar flexibilidad a la memoria. La reactivación estabiliza y refina la memoria (Dudai y Eisenberg, 2004), de tal modo que la reconsolidación necesita del denominado error predictivo. El error predictivo es definido como la discrepancia entre la situación actual y

la esperada, como consecuencia por ejemplo de un cambio en la contingencia de los refuerzos (Sevenster et al, 2013).

RECONSOLIDACIÓN VS EXTINCIÓN

Cabe destacar que el procedimiento de reactivación de la memoria es en sí mismo es un procedimiento de extinción. La presentación de un CS sin el US tiene como consecuencia una disminución de la CR, debido al aprendizaje de una nueva asociación CS-noUS. Por lo que la exposición a un recordatorio produce dos efectos distintos, una reducción de la CR, provocada por un nuevo aprendizaje, y una estabilización de la memoria ya adquirida (Nader, 2003; Dudai 2004). Para poder diferenciar los dos fenómenos hay que tener en cuenta el tiempo de exposición al CS. Sólo en el caso que la exposición al recordatorio (CS) sea de corta duración se produce principalmente reactivación; en cambio, cuando el tiempo de exposición aumenta aparece el fenómeno de extinción (Eisenberg et al, 2003; Power et al, 2006). Los dos procesos están regulados por receptores NMDA. La inyección de MK-801 (antagonista NMDA) justo después de un protocolo de extinción produce un déficit en la consolidación de la extinción, dando como resultado un aumento de la CR en una exposición posterior respecto a los niveles observados al final de la extinción. En cambio, la inyección de MK-801 justo después de un protocolo de reactivación (presentación breve del CS) produce el efecto contrario, una disminución de la CR, poniendo de manifiesto la existencia, y a la vez la interrelación, que hay entre estos dos fenómenos (Lee et al, 2006). Sin embargo, se pueden combinar los efectos de estos dos fenómenos para disminuir una CR. Se ha mostrado que realizar una extinción dentro del período de la ventana de reconsolidación (después de una reactivación) disminuye la CR 24 h más tarde e incluso bloquea los efectos de recuperación de la respuesta producidos por recuperación espontánea, reanudación o restauración (Monfils et al, 2009). Recientemente también se ha descrito este efecto de la extinción en la ventana de reconsolidación en humanos (Schiller et al, 2010). Asimismo, otro estudio realizado en humanos ha mostrado que la extinción realizada después de la administración de un recordatorio (CS) produce una disminución de la activación de la BLA típicamente observada durante posteriores exposiciones al CS (Agren et al, 2012), mostrando una disminución de la activación del circuito cerebral relacionado con el miedo (ver apartado 9.1.1. Neuroanatomía de la Consolidación y la reconsolidación).

Se ha observado que la administración de corticosterona después de la reactivación de la memoria por la presentación del CS (contexto) produce una disminución de la memoria de miedo cuando los animales son expuestos posteriormente al contexto (Cai et al, 2006; Abrari et al, 2008). Los efectos, igual que en la consolidación, son dosis-dependientes y únicamente se observa una reducción de la CR cuando se administran dosis altas (más de 3 mg/kg). Sin embargo, estos efectos de la administración de glucocorticoides (corticosterona) suelen interpretarse como una mejora en la consolidación de la extinción más que como una perturbación de la memoria (como ocurriría en el caso de la consolidación). Esta hipótesis se basa en el hecho de que aunque la administración de diferentes tratamientos como la corticosterona, la anisomicina (inhibidor de la síntesis de proteínas) o el propanolol (antagonista de los receptores β -adrenérgicos) tras la reactivación tengan como consecuencia una disminución de la CR, sólo los animales tratados con corticosterona y no los tratados con anisomicina o propanolol muestran restauración del miedo condicionado por la administración del US (Cai et al, 2006; Abrari et al, 2008), sugiriendo que la memoria ha desaparecido.

7. GENERALIZACIÓN

La CR observada como consecuencia de un condicionamiento no se restringe en muchos casos sólo al CS y puede desencadenarse también por otros estímulos diferentes al utilizado para inducir el condicionamiento. Este fenómeno se denomina generalización. La primera característica de este fenómeno es que existe un gradiente de generalización, es decir, que el grado de generalización es proporcional a la semejanza entre el estímulo nuevo y el CS. Este aspecto del aprendizaje tiene valor adaptativo, dado que el organismo puede responder a otras situaciones partiendo de una sola experiencia, haciéndoles más eficientes y adaptados al medio. Las conductas más adaptadas serán aquellas que hayan conseguido encontrar un mejor equilibrio entre la discriminación y generalización.

La relación existente entre la adquisición del miedo condicionado y la generalización del mismo queda reflejada en la ausencia de generalización del miedo a otros contextos en aquellos animales sometidos al procedimiento de choque inmediato (Radulovic et al, 1998a). La aparición del fenómeno de generaliza-

ción de una situación a otra, o de un estímulo a otro, se debe en parte a la capacidad del organismo de detectar que situaciones o estímulos son parecidos al original y de juzgar si estos van a predecir también la aparición del US (Shepard, 1987). En un realizado por Radulovic y colaboradores (1998a) muestran como ratones de la cepa C57BL6/6N (caracterizados por presentar elevados niveles de generalización del miedo) sometidos a un procedimiento de condicionamiento de miedo al contexto mostraban una falta de discriminación entre el contexto condicionado y otro distinto a las 24h. Sin embargo, este elevado grado de generalización era revertido si se realizaba una extinción de la respuesta de miedo en el contexto generalizado. De este modo se obtenía un buen índice de discriminación entre los dos contextos 5 día más tarde, mostrando que aunque la respuesta condicionada y la generalizada estén directamente relacionadas pueden modificarse de manera independiente.

Existen diversas teorías del procesamiento del contexto que tienen como objetivo explicar el proceso que subyace al fenómeno de la generalización. Clásicamente las teorías elementales (Rescorla y Wagner, 1972) y las configuracionales (Pearce, 1994) se han ido alternando para, finalmente, dejar paso a modelos que mezclan parte de las dos corrientes anteriores y postulan la existencia de los dos procesos, defendiendo el concepto de *pattern completion* (Rudy et al, 2004). Este concepto pone de manifiesto la existencia del procesamiento dual del contexto, una que englobaría el contexto como un todo y la otra, mediante los elementos separados. Sin embargo, los elementos procesados por separado tienen la capacidad de evocar el concepto global, ya que las dos imágenes del contexto están interrelacionadas. La diferencia fundamental entre las primera dos teorías es la manera en que conciben el contexto. Mientras que la teoría elemental entiende el contexto como la suma de las características diferenciales específicas que definen a cada uno de los estímulos que lo conforman, la configuracional entiende el contexto como un todo indivisible que se integra para formar una imagen global (Rudy y O'Really, 1999).

González y colaboradores (2003), realizaron un estudio para comprobar cuál de las teorías era la más acertada para explicar el proceso de generalización. Diseñaron un experimento en el que tras un condicionamiento de miedo al contexto, realizaban pruebas de generalización añadiendo o retirando elementos del contexto. Los resultados obtenidos mostraban que sólo la retirada

de elementos del contexto (no la suma de elementos nuevos) modificaba el grado de generalización de la CR, provocando una disminución de la CR (freezing) a medida que se retiraban elementos del contexto original. Los resultados obtenidos iban en consonancia con otros anteriores que también mostraron que la retirada de elementos del contexto condicionado producía una mayor disminución de la CR (freezing) (Brandon et al, 2000). El hecho de que la modificación de los elementos no elimine la CR y que la suma de elementos al contexto no modifique la generalización, pone de manifiesto la coexistencia de dos tipos de procesamiento, uno global y otro elemental (Rudy et al, 2004).

Es importante remarcar que no sólo el porcentaje de variación de la semejanza entre estímulos (o entre el contexto original y el de prueba) puede estar alterando el gradiente de generalización, existen otros factores importantes:

Intensidad del US: a mayor intensidad del US usado en el condicionamiento mayor generalización se observará en otros ambientes, en el caso de un condicionamiento de miedo al contexto, o frente a otros estímulos específicos, como por ejemplo, otro tono distinto al utilizado durante la adquisición del miedo condicionado a una clave (Baldi et al, 2004; Laxmi et al, 2003).

Grado de adquisición: un mayor entrenamiento debería conducir a menor generalización (Bouton, 2007). Sin embargo hay estudios que han mostrado que un sobre-entrenamiento produce un mayor grado de generalización (Laxmi et al, 2003). Este efecto estaría asociado al aumento del número de US presentados cuando se lleva a cabo un sobre-entrenamiento, lo que los autores interpretan como un modo de aumentar la intensidad del US. Como hemos comentado previamente, el aumento de la intensidad del US conllevaría un aumento de la generalización. Cabe destacar que en este estudio no se modifica independientemente el número y la intensidad por lo que no pueden diferenciar si un parámetro concreto está influenciando más que el otro.

Intervalo entre la adquisición del condicionamiento y el test: El grado de generalización va aumentando a medida que vamos separando en el tiempo la adquisición y la prueba de generalización (Biedenkamp et al, 2007; Pamplona et al, 2011; Wiltgen y Silva, 2007). Sin embargo encontramos un efecto inverso cuando se aplican intervalos cortos, como por ejemplo 3 h vs 24 h, mostrando menor grado de generalización a un tono en aquellos animales expuestos al test 24 h más tarde (Rudy y Pugh, 1996). Los autores justifican este

efecto diferencial con el tiempo necesario para realizar una representación correcta de contexto/clave.

Numerosos estudios han señalado la formación de una memoria traumática exagerada como una de las causas del desarrollo del PTSD (para revisión Siegmund y Wotjack, 2006). La formación de esta memoria traumática mediante condicionamiento clásico conduciría a la aparición de generalización y dicha generalización del miedo podría ser uno de los factores implicados en el mantenimiento de esta patología (Parson y Ressler, 2012). El estudio del PTSD mediante modelos animales basados en el condicionamiento del miedo permite reproducir parte de esta sintomatología asociada al desarrollo de una memoria traumática y facilita poder encontrar los mecanismos que están detrás del desarrollo de esta generalización.

8. SENSIBILIZACIÓN

Una cuestión crítica cuando se trabaja con aprendizajes que requieren de la utilización de estímulos estresantes, como por ejemplo el miedo condicionado, es diferenciar si los efectos observados en otros contextos diferentes al del condicionamiento son debidos a un proceso de sensibilización producido por la propia exposición al estímulo estresante (sensibilización) o si son el resultado del propio paradigma de condicionamiento (generalización). No tener en cuenta este hecho puede llevar a interpretaciones erróneas de los resultados, ya que la atribución de consecuencias debidas al establecimiento de un aprendizaje asociativo o a un proceso no asociativo puede tener implicaciones distintas.

En la memoria de miedo, siempre debemos distinguir entre dos componentes distintos: asociativos y no asociativos. El paradigma de miedo condicionado incluye la exposición del animal a una situación estresante, y los animales expuestos previamente a un choque eléctrico pueden mostrar, además de una respuesta de miedo frente al contexto o clave condicionada y frente a otros contextos o claves debido a la generalización, una respuesta alterada frente estímulos no relacionados en absoluto con la situación de condicionamiento.

Este último implicaría un fenómeno de sensibilización pueden durar semanas o meses (Stam, 2007).

Para poder diferenciar estos dos componentes existen básicamente dos tipos de procedimientos. Con el uso de estos procedimientos que implica animales que han estado sometidos al estímulo estresante sin el componente asociativo, podemos saber cuáles de los cambios conductuales y fisiológicos que muestren serán exclusivamente atribuibles a la exposición al estímulo estresante per se.

☒ Pseudocondicionamiento: usado normalmente cuando se utiliza el paradigma de miedo asociado a una clave. Consiste en presentar el US y el CS desapareados, no permitiendo o entorpeciendo la asociación entre estímulos.

☒ Choque inmediato: utilizado cuando se estudia el condicionamiento al contexto utilizando un solo choque. Este procedimiento evita la formación del condicionamiento restringiendo la exploración del contexto previa al choque eléctrico. Los animales que no pueden explorar el contexto antes de recibir el US no desarrollan miedo al contexto (Fanselow, 1990).

El término "déficit del choque inmediato" fue acuñado por Fanselow (1990) para referirse a la falta de condicionamiento, medido mediante la respuesta de freezing, que presentaban los animales sometidos a choque inmediato cuando eran expuestos de nuevo al contexto donde se les había administrado el choque. Los animales sometidos al procedimiento de choque eléctrico inmediato, a diferencia de los condicionados, no muestran generalización de la conducta de freezing en otros ambientes, ni hipo-actividad en el EPM (Radulovic et al, 1998a). Además, la administración de un choque eléctrico inmediato en la prueba de evitación pasiva (step-down) tampoco da lugar a un aumento de la latencia de bajada de la plataforma cuando los animales son expuestos 24 h más tarde a la prueba, ni muestran una potenciación de la respuesta de sobresalto acústico inducida por un CS específico (Kiernan et al, 1995).

Sin embargo, algunos resultados indican que animales sometidos a este procedimiento sí pueden presentar freezing en el contexto donde habían recibido el choque inmediato (Bevins y Ayres, 1994; 1995; Lattal y Abel, 2001). Estas discrepancias parecen explicables porque el aumento de la intensidad del choque puede ser importante para reducir el déficit. Los autores interpreta-

ron que los animales pueden condicionarse a otros elementos del entorno como por ejemplo el método de transporte, la manipulación o la habitación (Bevins et al, 1997; 2000). Los elementos del entorno se presentan en una relación temporal adecuada respecto al choque y con intensidades elevadas del US se potenciaría el valor predictivo de todos esos elementos, favoreciendo su condicionamiento. Otros estudios también han aportado algunos datos interesantes en la misma línea, como por ejemplo que la repetición del procedimiento de choque inmediato conlleva un aumento de la CR, o que someter a los animales a un choque inmediato previo a otra sesión de adquisición tiene un efecto facilitador del condicionamiento posterior (Landeira-Fernández et al, 2006). Asimismo, la exposición previa a un choque 24 h antes (en un contexto distinto), aumenta la respuesta de freezing delante del contexto después de un procedimiento de choque inmediato (Fanselow et al, 1993), mostrando algún tipo de efecto sensibilizador producido por la exposición previa al US. Es posible que la sensibilización pueda explicar el incremento en el freezing causado por la intensidad creciente del choque. Animales expuestos a un protocolo de condicionamiento de miedo a un tono utilizando intensidades crecientes de choque eléctrico muestran un aumento intensidad-dependiente de la respuesta de freezing delante del tono. Pero, sorprendentemente, esta mayor respuesta al tono también se observa, y en la misma magnitud, en aquellos sujetos a los cuales no se les había condicionado al tono sino al contexto (Kamprath y Wotjack, 2004), lo que sugiere una sensibilización de la respuesta a sonidos intensos.

Existen otros parámetros que pueden mostrar sensibilización como consecuencia de la exposición a estímulo estresante. Uno de los parámetros más estudiado ha sido la ASR. La exposición a las heces/orina del depredador o a la inmersión forzada produce un aumento de la ASR medida a las 24 h, siendo observable aún a los 30 días después de la exposición (Cohen et al, 2004). Se ha observado un efecto similar con la exposición previa al TMT, mostrando que tanto inmediatamente como 2 y 3 días después de 2 min de exposición al TMT los animales mostraban un aumento de la ASR (Hebb et al, 2003). Cuando el estímulo aversivo utilizado como estrés es un choque eléctrico los datos obtenidos muestran que inmediatamente después de la exposición a un choque eléctrico se observa un aumento de la ASR (Davis, 1989) que puede durar hasta 7 o 10 días, en función del número de choques eléctricos administrados (Servatius et al, 1995). Datos recientes han mostrado como este aumento de la ASR se observa hasta los 28 días después del choque eléc-

trico y además también es observable en animales que han estado sometidos a un procedimiento de choque inmediato (Sauerhöfer et al, 2012). Estos últimos datos, conjuntamente con los obtenidos previamente por muchos laboratorios (Stam, 2007) ponen de manifiesto la existencia de efectos incondicionados que estarían provocando un aumento de la ASR, probablemente como reflejo de hiperarousal. No obstante, también encontramos datos que indican que la exposición previa a una sesión de choques eléctricos sólo es capaz de inducir un aumento en la ASR en el contexto donde fueron expuestos al choque (Richardson y Elsayed, 1998). A la luz de estos datos, algunos autores defienden la postura de que el contexto en el cuál se valora la ASR es de gran importancia. Generalmente la prueba de ASR se lleva a cabo en un contexto distinto al usado para la administración de los choques eléctricos, sin embargo la falta de discriminación entre los contextos (estrés vs test de ASR), debido a su similitud, podría explicar parte del aumento de la ASR (Richardson, 2000).

Desde el punto de vista de la respuesta del eje HPA, está bien establecido que la exposición previa a un estímulo estresante produce una respuesta aumentada delante de otros estímulos estresantes; es decir, se produce una sensibilización heterotípica (Johnson et al, 2002; Stam, 2007). Por lo que nos encontramos en el mismo escenario que con las consecuencias conductuales: tenemos dos causas distintas que pueden estar afectando a la misma respuesta. La diferenciación entre la respuesta hormonal condicionada y sensibilización no ha sido muy estudiada en la literatura. (Cordero et al, 1998; van Dijken et al, 1993; van de kart et al, 1991).

9. NEUROANATOMÍA DEL MIEDO CONDICIONADO

La neuroanatomía del al miedo condicionado ha sido un tema muy estudiado en los últimos años. Conocer las áreas y circuitos cerebrales implicados en el procesamiento y el almacenamiento de memorias traumáticas ha despertado gran interés por sus posibles aplicaciones en el tratamiento de patologías psiquiátricas como el PTSD (para revisión ver Fanselow y Poulos, 2005; Mahan y Ressler, 2011). La amígdala, la FH y la PFC son las estructuras que se consideran más importantes para el procesamiento del miedo (LeDoux, 2000; Paré et al, 2004). A grandes rasgos, la información sobre el CS discreto, proveniente de áreas talámicas o corticales, converge en el núcleo lateral de la amígdala (LA), mientras que la información referente al contexto llega al complejo

BLA proveniente de la FH. La información relativa al US llega a la CeA vía médula espinal entre otras estructuras, pero como esta área no recibe información sobre el CS, la integración de la información se produce en la LA mediante conexiones intra-amigdalares. El complejo BLA mediante proyecciones a la CeA, que es el núcleo de salida más importante de la amígdala, envía la información hacia zonas del tronco y el hipotálamo, promoviendo la expresión del miedo mediante respuestas motoras (freezing) y fisiológicas (LeDoux, 2000; Fanselow y Poulos, 2005)



Figura 3: Esquema simplificado del circuito de procesamiento del miedo.

9.1 AMÍGDALA

Numerosos estudios han demostrado la importancia de la amígdala y de sus conexiones con la FH y la PFC en la adquisición del miedo condicionado (revisión Fend y Fanselow, 1999; Paré et al 2004). Las primeras aproximaciones mostraron que la lesión completa de la amígdala producía una desaparición de la adquisición del miedo condicionado a una clave (Phillips y LeDoux, 1992). Posteriormente, la realización de lesiones más precisas mostraron la existencia de dos subregiones dentro de la amígdala diferenciadas por su funcionalidad: el complejo BLA y la CeA.

El complejo BLA está formado en rata por los núcleos de la amígdala lateral (LA), basolateral (BL) y basomedial (BM). Tanto el bloqueo farmacológico del complejo BLA (Wilensky et al, 1999; Ponnusamy et al, 2007), como la lesión realizada antes de la adquisición (Maren, 1998; Koo et al, 2004), pero no después (Wilensky et al, 1999), impide la formación de la memoria de miedo tanto la contextual como la asociada a una clave. Cabe destacar que este déficit no es atribuible a una ralentización de la curva de aprendizaje ya que sesiones de sobre-entrenamiento tampoco consiguen crear una memoria sólida a largo plazo (Maren, 1998). Además animales con el BLA lesionado antes de la adquisición sólo muestran efecto de una sesión de restauración del miedo condicionado (con la administración del US) cuando ésta sesión es llevada a cabo 7 días después de la adquisición y no a los 30 días. Estos datos sugieren que, aunque puede existir codificación de la información sin BLA, esta es muy lábil y se disipa con el paso del tiempo (Poulos et al, 2009). No obstante, la posibilidad de aprendizaje con independencia de la integridad de la BLA pone de manifiesto la posible existencia de vías alternativas de procesamiento. El BNST se ha planteado como esta vía alternativa, ya que la lesión conjunta de la BLA y el BNST previene la formación y la expresión de la memoria de miedo, incluso aunque se lleve a cabo un sobre-entrenamiento (Poulos et al, 2010).

Dentro del complejo BLA, se ha señalado a la LA como la estructura concreta responsable del aprendizaje de la relación entre CS y US (LeDoux, 2000). Esta estructura es la que recibe directamente información del CS por vías talámicas y corticales como información nociceptiva del US por las vías espino-talámicas y cortical. La lesión total de esta estructura bloquea por completo la adquisición del miedo condicionado (LeDoux et al, 1990). Asimismo, estudios de lesiones selectivas muestran que sólo las lesiones en la LA y la CeA producen el bloqueo del aprendizaje (Nader et al, 2001).

Las lesiones permanentes pre-adquisición de la CeA no permiten distinguir si los efectos encontrados son debidos a interferencias en la adquisición o en la expresión (Kim y Davis, 1993), por lo que los estudios mediante inactivaciones temporales son indispensables. La inactivación temporal con muscimol (agonista GABAérgico) de la CeA previa a la adquisición bloquea la adquisición del miedo condicionado, así como la expresión de este si es inactivada inmediatamente antes del test. Además, una inyección de anisomicina (inhi-

bidor de la síntesis de proteínas) en la CeA inmediatamente después de la adquisición bloquea la consolidación de la memoria (Wilensky et al, 2006). Tradicionalmente se ha descrito la CeA como la estructura responsable de la expresión de las respuestas de miedo. Está bajo el control inhibitorio de la LA y proyecta a regiones del tronco e hipotálamo controlando así las respuestas motoras y autonómicas frente a un CS (Paré et al, 2004; Fanselow y Poulos, 2005). No obstante, a la luz de estos y otros resultados, se ha propuesto que la CeA no se limita únicamente a ser un centro efector de los estímulos que recibe vía LA, sino que estaría jugando un papel importante en la adquisición, almacenamiento y expresión del miedo condicionado (Paré et al, 2004; Wilensky et al, 2006).

Por otra parte, la inactivación (Herry et al, 2008; Amano et al, 2011) o lesión permanente del núcleo basal de la amígdala (BA), compuesto por la BL y la BM (Anglada y Quirk, 2005) realizada posteriormente a la adquisición (Nader et al, 2001), impide la expresión de las memorias de miedo. Los autores postulan que la BA es la vía principal de conexión entre la LA y la CeA permitiendo la salida de información necesaria para la expresión del miedo condicionado. Pero en ausencia de BA, la LA tiene conexiones directas con la CeA que le permitirían canalizar de forma alternativa la expresión de la respuesta; razón por la cual, las lesiones de la BA previas a la adquisición no impiden el recuerdo de la memoria de miedo (Nader et al, 2001). Se ha observado que existen diferentes poblaciones neuronales en la BA encargadas de codificar de manera diferencial la adquisición y la extinción (Herry et al, 2008). Una población responde selectivamente durante y después de la presentación de los CS en la fase de adquisición del miedo condicionado. La segunda responde durante la fase de extinción, y lo hace selectivamente cuando la presentación del CS ya no produce CR. La dos poblaciones neuronales varían su actividad en relación a la CR, el primer grupo serían excitadoras y el segundo inhibidoras de la CR. En este estudio no encontraron este mismo patrón en la LA, aunque cabe mencionar que otros casos sí lo han observado (Repa et al, 2001).

9.2. FORMACIÓN HIPOCAMPAL

Si nos centramos en el miedo condicionado al contexto, una estructura fundamental es la formación hipocampal (FH). La información sobre el contexto elaborada en la FH converge conjuntamente con la información del estímulo aversivo US (v.g. choque eléctrico) en el complejo BLA (Fanselow y Poulos,

2005). Lesiones (Phillips y LeDoux, 1992; 1994) o inactivaciones (Bast et al, 2003), previas a la adquisición, en la parte dorsal del hipocampo impiden el recuerdo del contexto dónde se ha administrado el choque eléctrico, pero no bloquean el miedo condicionado a una clave. Asimismo lesiones totales de la FH (Kim y Fanselow, 1992) o específicamente del hipocampo dorsal (Anagnostaras et al, 1999), realizadas después de la adquisición, producen también un bloqueo de la memoria de miedo al contexto siempre que esta lesión se produzca dentro de un plazo de 24 h posterior a la adquisición. Las lesiones realizadas en intervalos de tiempo más largos (7, 14 o 28 días) únicamente producen una disminución de la CR pero no un bloqueo del recuerdo, mostrando una implicación temporal del hipocampo en la estabilidad de la memoria. Aunque también se han descrito efectos de la lesión del hipocampo dorsal 28 días post adquisición (Maren et al, 1997). Cabe añadir que el bloqueo de los receptores NMDA mediante la administración de MK-801 en el hipocampo dorsal previa a la adquisición reduce específicamente la memoria de contexto (Bast et al, 2003).

Aunque tradicionalmente la FH se ha relacionado estrechamente con el recuerdo del contexto, la lesión posterior a la adquisición (24 h) del hipocampo dorsal además de reducir la respuesta de freezing al contexto condicionado, también reduce el freezing delante del tono cuando el protocolo utilizado es un condicionamiento de traza (Quinn et al, 2002; Chowdhury et al, 2005), es decir, cuando existe una demora entre el final del CS y al presentación del US. Los autores apuntan a un incremento de la importancia del contexto en este tipo de protocolos que promueve la asociación CS-contexto, involucrando al contexto en la reactivación de la memoria del tono.

Por su parte, la implicación del hipocampo ventral en la adquisición y recuerdo del miedo condicionado es un tema controvertido. Estudios de inactivaciones muestran que la inhibición de la síntesis de proteínas en el hipocampo ventral previa a la adquisición no tiene ningún efecto en la memoria a corto plazo (1 h) pero si a largo plazo (48 h) (Rudy y Matus-Amat, 2005). Estos datos sugieren una posible función compartida tiempo-dependiente entre el hipocampo dorsal y el ventral en la consolidación de la memoria.

Sin embargo, a pesar del gran número de datos que apoyan la implicación de la FH en la adquisición y consolidación del miedo condicionado a un contexto, existen datos controvertidos que arrojan algunas dudas sobre su papel exacto. La existencia de datos mostrando una falta de efecto de una lesión,

previa a la adquisición, del hipocampo dorsal sobre el recuerdo del contexto condicionado (Phillips y LeDoux, 1994; Maren et al, 1997; Frankland et al, 1998; Biedenkapp y Rudy, 2009) hace necesaria una reflexión sobre el papel de la FH en la adquisición del condicionamiento de miedo al contexto. Se ha sugerido (Anagnostaras et al, 2001; Rudy, 2009) que en condiciones normales (sin lesiones de la FH) el animal puede establecer una representación del contexto (tarea que es hipocampo-dependiente) que es la que se va a asociar con el US. Sin embargo, si la adquisición se produce bajo una hipo-funcionalidad o una lesión de la FH (lesión pre-adquisición), la capacidad para asociar y condicionar claves específicas del contexto (v.g. olor, ruido, etc) con el US, que no requieren de la integridad de la FH, se convierte en la vía principal de procesamiento de ese aprendizaje. En el animal intacto, la vía predominante sería FH-dependiente y esta bloquearía la vía de asociación con señales específicas. Sólo tras la lesión de la FH se utilizaría la vía secundaria, que implica procesar los elementos de forma separada. Dado que para recuperar la información durante el test se requeriría la integridad de la FH, para recuperar la representación global del contexto, las lesiones posteriores a la adquisición producirían efectos drásticos sobre la memoria.

9.3. CORTEZA PREFRONTAL

Muchos datos indican que la conexión BLA-FH-mPFC es de gran importancia para la extinción del miedo condicionado. La corteza prefrontal (PFC), principalmente la IL y la PrL, estaría ejerciendo un papel inhibitorio en este circuito del procesamiento del miedo inhibiendo a la amígdala (LeDoux, 2000; Paré et al, 2004). Lesiones de la IL previas a la adquisición del miedo condicionado producen una alteración del proceso de extinción del condicionamiento asociado a un tono, a pesar de que los animales muestran una tasa de aprendizaje normal (Morgan y LeDoux, 1995; Quirk et al, 2000; Lebron et al, 2004). Esta alteración está relacionada con la recuperación de la memoria de extinción; es decir, los animales lesionados son capaces de extinguir la CR dentro de la sesión de extinción, pero cuando son expuestos de nuevo 24 h más tarde al CS (tono) la CR reaparece mostrando niveles superiores a los controles (Quirk et al, 2000). En consonancia con lo propuesto, la inactivación de la IL justo antes de la sesión de extinción induce déficits específicamente en la consolidación de la extinción del miedo condicionado a un tono (Sierra-mercado et al, 2011). Además la consolidación de dicha extinción

requiere de la actividad de los receptores NMDA (Burgos -Robles et al, 2007) y de la síntesis de proteínas en la IL (Santini et al, 2004).

Quirk y colaboradores (2000) interpretan el déficit en la extinción producido por la lesión de la IL como una pérdida del efecto modulador de la IL más que como una incapacidad del animal de adquirir o extinguir un aprendizaje. Esta interpretación se desprende de dos tipos de datos obtenidos en varios estudios (Quirk et al, 2002; Lebron et al, 2004): (i) los animales con una lesión en el IL extinguen más rápido en la segunda sesión (24 h) que en la primera, (ii) en la segunda extinción estos animales muestran una disminución de la CR más rápida que los animales que no habían sido expuestos a la primera extinción. Estos datos no sugieren una alteración en el proceso de extinción, sino que la IL podría ser necesaria para la recuperación de la memoria de la extinción almacenada en otras estructuras.

El papel inhibitorio de la IL sobre la respuesta de miedo estaría relacionado con las proyecciones de ésta a una zona situada entre la CeA y la BLA que contiene las neuronas intercaladas, que son de naturaleza GABAérgicas y están encargadas de inhibir la actividad de la CeA. La hipótesis es que la extinción potenciaría las señales GABérgicas que le llegan a la CeA a través de las neuronas intercaladas, contrarrestando la actividad excitadora que proviene de la BLA (para revisión Quirk et al, 2006).

Por otro lado, la inactivación de la PrL antes de la adquisición del miedo condicionado o del test induce una reducción de los niveles de freezing, tanto en el condicionamiento a una clave como al contexto, sin afectar a la consolidación del aprendizaje (Corcoran y Quirk, 2007). No obstante, estas lesiones podrían estar afectando a la respuesta directa a la situación estresante (Radley et al, 2009). Se ha observado que animales con una lesión de la PrL previa a la exposición a un estímulo estresante muestran un aumento de la activación del PVN delante de estímulos emocionales. Además, la inactivación temporal antes de la extinción (Sierra-mercado et al, 2011) provoca, de nuevo, un déficit en la expresión del miedo, reflejada en una disminución del freezing, sin afectar a la posterior consolidación de la memoria, pudiendo observar niveles parecidos a los de los animales no inactivados en exposiciones sucesivas al CS. Un efecto similar es encontrado en la prueba de reanudación (Orsini et al, 2011): la desconexión de la comunicación entre la PrL y el hipocampo ventral produce un bloqueo de la recuperación de la CR inducido por el cambio de contexto tras la extinción (reanudación).

OBJETIVOS

HIPÓTESIS

- 1) La hipo-actividad en ambientes nuevos observada tras la exposición a una sesión de choque eléctrico estaría relacionada con la capacidad de dicho choque para producir condicionamiento de miedo al contexto, es decir, se trataría de un fenómeno asociativo.
- 2) Esta generalización daría lugar a una conducta de cautela en ambientes desconocidos que no implicaría un elevado nivel de miedo/ansiedad.
- 3) Debido a la relación existente entre el desarrollo de la hipo-actividad y el condicionamiento del miedo, dicha hipo-actividad no aparecería cuando se impide el condicionamiento o tras la extinción del mismo.
- 4) La exposición a un estímulo estresante de elevada intensidad como la inmovilización en plancha (IMO) no parece tener efectos a largo plazo sobre la ansiedad o la actividad en ambientes nuevos, lo que podría estar relacionado con una dificultad de los animales para establecer un condicionamiento del miedo al contexto asociado a la IMO.
- 5) La intensidad del estímulo nocivo (choque) podría estar relacionada con la magnitud del condicionamiento del miedo al contexto y también con la hipo-actividad en ambientes nuevos. La valoración de distintas conductas además del freezing puede contribuir a diferenciar mejor los cambios causados por el choque eléctrico.
- 6) La valoración de la respuesta del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) en las distintas situaciones nos permitirá conocer mejor la sensibilidad de este eje endocrino a las situaciones de estrés y al condicionamiento, así como la relación entre variables conductuales y endocrinas.

OBJETIVOS

- 1) Demostrar que la exposición a una sesión breve de choques eléctricos es capaz de inducir a largo plazo no sólo efectos condicionados sino también hipo-actividad en ambientes nuevos (no asociados al choque).
- 2) Validar la respuesta del eje HPA como índice de condicionamiento del miedo al contexto utilizando el choque eléctrico como estímulo nocivo, estudiando la respuesta al contexto del choque pero también a otros ambientes para descartar una posible contribución de la sensibilización.
- 3) Demostrar que la aparición de hipo-actividad está relacionada directamente con el establecimiento del condicionamiento de miedo al contexto, utilizando el procedimiento de choque inmediato, que permite distinguir entre condicionamiento y sensibilización.
- 4) Demostrar que la inmovilización (IMO), a diferencia del choque, no da lugar ni a condicionamiento del miedo al contexto (o a señales discretas como la propia tabla de IMO) ni a hipo-actividad en ambientes nuevos, en apoyo de la hipótesis de la predisposición biológica para ciertos tipos de asociaciones.
- 5) Estudiar si el número o la intensidad de los choques eléctricos administrados durante la adquisición del miedo condicionado al contexto es capaz de potenciar el condicionamiento del miedo al contexto y la generalización del miedo a otros ambientes.
- 6) Demostrar que la hipo-actividad en ambientes nuevos desaparece cuando se extingue el condicionamiento del miedo al contexto.
- 7) Estudiar si la exposición al choque en contextos más grandes que los utilizados habitualmente en rata amplía el repertorio conductual de los animales y si estas conductas dan información adicional a la aportada por el freezing.
- 8) Profundizar en la validez de las hormonas del eje HPA para reflejar los efectos conductuales inmediatos y a largo plazo de la exposición al choque eléctrico, incluyendo el condicionamiento del miedo al contexto, la extinción y la generalización.

CAPÍTULO

1

A **SINGLE FOOTSHOCK**
CAUSES **LONG-LASTING**
HYPOACTIVITY
IN **UNKNOWN ENVIRONMENTS**
THAT IS DEPENDENT ON THE DEVELOPMENT
OF **CONTEXTUAL FEAR**
CONDITIONING

NÚRIA DAVIU
SILVIA FUENTES
ROSER NADAL
ANTONIO ARMARIO

NEUROBIOLOGY OF LEARNING AND MEMORY 94 (2010) 183-190

KEYWORDS

STRESS, ANXIETY, FEAR GENERALIZATION
HYPOTHALAMIC-PITUITARY-ADRENAL AXIS
POST-TRAUMATIC STRESS DISORDER (PTSD)

ABSTRACT

EXPOSURE TO A SINGLE SESSION OF FOOTSHOCKS INDUCES LONG-LASTING INHIBITION OF ACTIVITY IN UNKNOWN ENVIRONMENTS that markedly differ from the shock context. Interestingly, these effects are not necessarily associated to an enhanced anxiety and interpretation of this hypoactivity remains unclear. In the present experiment we further studied this phenomenon in male Sprague–Dawley rats.

In a first experiment, a session of three shocks resulted in hypoactivity during exposure, 6–12 days later, to three different unknown environments. This altered behaviour was not accompanied by a greater hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) activation, although greater HPA activation paralleling higher levels of freezing was observed in the shock context.

In a second experiment we used a single shock and two procedures, one with pre-exposure to the context before the shock and another with immediate shock that did not induce contextual fear conditioning. Hypoactivity and a certain level of generalization of fear (freezing) to the unknown environments only appeared in the group that developed fear conditioning, but no evidence for enhanced anxiety in the elevated plus-maze was found in any group.

The results suggest that if animals are able to associate an aversive experience with a distinct unknown environment, they would display more cautious behaviour in any unknown environment and such strategy persists despite repeated experience with different environments. This long-lasting cautious behaviour was not associated to greater HPA response to the unknown environment that was however observed in the shock context. The present findings raised some concerns about interpretation of long-lasting behavioural changes caused by brief stressors.

INTRODUCTION

ALTHOUGH PHYSIOLOGICAL AND BEHAVIOURAL CONSEQUENCES OF ACUTE AND CHRONIC EXPOSURE TO STRESS have been extensively studied for decades, most reports focused on its short-term (the first 48 h post-stress) consequences. However, in the 1990s, several papers appeared that renewed the interest for the long-term effects of a single exposure to stress. Koolhaas et al. (1990) found that a single session of social-defeat induced in rats long-lasting behavioural changes reminiscent of enhanced anxiety and depression-like behaviour. Later on, Tilders' lab reported that a single exposure of rats to electric footshocks reduced activity in unknown environment even 4 weeks after the initial exposure to shocks (Van Dijken, Mos, van der Heyden, & Tilders, 1992; Van Dijken, Van der Heyden, Mos, & Tilders, 1992; Van Dijken et al., 1993).

Since then, an important number of papers have **reported long-lasting effects of a single session of stress** on anxiety-like behaviour, hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) activity and brain responsiveness to further stress challenges (see Armario, Escorihuela, & Nadal, 2008). This growing interest is in great part related to the development of putative animal models of **post-traumatic stress disorders (PTSD)**. Acute and chronic exposure to traumatic events can result in long-lasting psychopathological consequences in a percent of particularly susceptible people. PTSD is characterized by strong memory of the aversive event that is very resistant to extinction, emotional numbing and a deficit in declarative memory (Blechert, Michael, Vriends, Margraf, & Wilhelm, 2007; McNally & Westbrook, 2006; Yehuda & Ledoux, 2007). These patients also showed physiological hyper-reactivity to stressors even if they are not related to the traumatic situation and, in some cases, alterations in the HPA axis, although results are controversial (De Kloet et al., 2006; Yehuda & LeDoux, 2007).

Most of the papers reporting long-lasting behavioural effects have used as stressors footshocks or exposure to predators or predator odours (see Armario et al. 2008 for a review). Exposure to predators or predator odours could be considered ethologically relevant stressors representing a risk of death. We and others have found that a single exposure to a cat or some cat odours resulted in long-lasting (up to several weeks) increases in anxiety-like behaviour as evaluated by the time spent in the open arms of the elevated plus-maze,

EPM (i.e. Adamec, Shallow, & Budgell, 1997; Cohen, Friedberg, Michael, Kotler, & Zeev, 1996; Cohen, Kaplan, & Kotler, 1999; Muñoz-Abellán, Andero, Nadal, & Armario, 2008; Muñoz-Abellán, Armario, & Nadal, 2010) and the amplitude of the acoustic startle response, ASR (i.e. Adamec, Blundell, & Burton, 2003; Cohen et al., 2004). However, in studying the effects of cat exposure, Adamec's lab have repeatedly found that, in contrast to the results with the EPM and the ASR, the behaviour of animals in another unknown environment such as the hole-board is usually not altered (i.e. Adamec et al., 1997; Adamec et al., 2003). In contrast, Tilders and collaborators observed that exposure to a single and brief session of moderated intensity shock (for instance, 10 shocks, 1 mA, 6 s of duration) resulted in long-lasting (days-weeks) reduction of the activity of the animals in open-fields and an exacerbated immobility response to sudden noise off when the tests were carried out under background noise (Van Dijken, Mos, et al., 1992; Van Dijken, Van der Heyden, et al., 1992; Van Dijken et al., 1993). This long-lasting hypoactivity in open-fields was maintained even if the animals were repeatedly exposed to the same apparatus (Van Dijken, Van der Heyden, et al., 1992).

Although these results were interpreted in terms of enhanced anxiety (Van Dijken, Mos, et al., 1992), classical anxiolytics only partially blocked this hypoactivity (Van Dijken, Tilders, Olivier, & Mos, 1992). Other labs have also found long-lasting hypoactivity in open-fields with a single shock session (Van den Berg, Lamberts, Wolterink, Wiegant, & Van Ree, 1998) accompanied by increased the latency to emerge from a protected box to an open space (the so-called defensive withdrawal behaviour) (Bruijnzeel, Stam, & Wiegant, 2001a, 2001b), supporting a shock-induced increase in anxiety. However, again, these effects have been found to be rather insensitive to anxiolytics and CRF antagonists administered prior to testing (Bruijnzeel et al., 2001a). In addition, changes in anxiety-like behaviour are not always detected (Pijlman & Van Ree, 2002). In fact, previous exposure to shock has been found to reduce rather than increase the ASR, concomitantly with the development of hypoactivity in open-fields (Pijlman, Herremans, van de Kieft, Kruse, & van Ree, 2003). Therefore, there is no strong evidence that long-lasting changes in activity in unknown environment elicited by a brief session of shock are mainly due to changes in anxiety.

Results from other labs also give support to the **dissociation between activity and anxiety**. After exposure to shocks, animals display defensive behaviour,

mainly characterized by immobility and freezing in the context previously paired with shock when shock is not present (i.e. Rau & Fanselow, 2009). Exposure of mice to shocks in a particular context results in the development of freezing in the context where the shock was previously administered and in partial generalization of freezing to other different contexts (Radulovic, Kammermeier, & Spiess, 1998). However, such generalization requires the acquisition of fear to the original shock context (contextual fear conditioning), in that generalization was not observed when animals received the shock immediately after being put into the shock chamber, a procedure that avoids the development of contextual fear conditioning (Radulovic et al., 1998). Interestingly, upon exposure to the EPM, the group of mice who acquired contextual fear conditioning showed an increase in the time spent in the open arms accompanied by a reduced number of total entries and entries in both arms (Radulovic et al., 1998). In the latter case, hypoactivity was associated with an increase in time spent in the open arms and therefore it is unlikely that behaviour was actually reflecting anxiety. Other experiments in mice with a single shock exposure have also demonstrated hypoactivity in novel environments with no evidence for enhanced anxiety (Kamprath & Wotjak, 2004).

AIMS

If exposure to shocks is not inducing an increase in trait-anxiety, is there any alternative explanation for long-lasting shock-induced hypoactivity? It can be hypothesized that when the animals experienced shocks in an unknown environment and established a contextual fear conditioning they would have learned that any unknown environment may be potentially dangerous. Thus, previous experience with shocks could result in a change in the behavioural strategy of the animals (more cautious behaviour) when again exposed to unknown environments, not necessarily related to a strong level of fear/anxiety. If this hypothesis is true, one can expect that hypoactivity in unknown environments would not be associated to an enhanced response of physiological systems that are sensitive to levels of fear. In this regard, plasma levels of HPA hormones have been found to be sensitive to the intensity of stressors (see Armario (2006) for a review) and, more specifically, reflect contextual fear conditioning caused by shocks (Merino, Cordero, & Sandi, 2000; Van de Kar, Piechowski, Rittenhouse, & Gray, 1991) and predator odours (Muñoz-Abellán, Daviu, Rabasa, Nadal, & Armario, 2009). Therefore, the purposes of the present work were to demonstrate that:

- (i) a brief session of shocks is able to induce long-lasting hypoactivity in unknown environments markedly different from the shock chamber;**
- (ii) this hypoactivity is dependent on the development of contextual fear conditioning;**
and
- (iii) hypoactivity in unknown environments did not reflect high levels of anxiety and would not be associated to an enhanced HPA response.**

MATERIALS AND METHODS

ANIMALS

We used forty-two 60 days old male Sprague–Dawley rats with the same characteristics as previously

STRESS PROCEDURES

Shocked rats were put into individual clear plexiglas boxes (19.7 x 11.8 x 20.0 cm) with a metal removable grid floor of 15 stainless steel rods, 0.4 cm diameter and spaced 0.9 cm centre to centre connected to a shocker that delivered scrambled AC current (Cibertec, Madrid, Spain). The animals were transported individually to the room in a black plastic cage (25 x 20 x 12 cm). The shock chambers were placed in a room with white walls and illuminated by a fluorescent white light (295 lux). The cage-mates were always tested simultaneously in the same stress room and under the same stress conditions.

EXPERIMENTAL DESIGN

EXPERIMENT 1

After the last day of handling, rats were randomly assigned to two groups: **(a) control**, **(b) shock** (n = 8 rats each). To be shocked animals were allowed to explore the chamber for 3 min and then received three shocks (1.5 mA, 3 s of duration, ITI 60 s) and after the last shock, animals remained for 1 min in the chamber. Control group was placed in the chamber for the same time without receiving shock. Six and seven days after shock, animals were exposed to a **rectangular open field (ROF)** and to a **circular open field (COF)**, respectively; 12 days after shock they were exposed to a **conditioned place preference box (CPP)**.

All the unknown environments procedures lasted 15 min and blood samples were taken immediately after the end of all the tests. A black curtain surrounded all tests and a red bulb was placed above the centre of the apparatus.

All the **behavioural tests** were placed in a different room from the one used in the shock session. The experimenter and the box (white plastic box with litter 29 x 27 x 14 cm) used to transport the rats from the vivarium to the room where the unknown environments were placed were also changed. Next day, 13 days post-stress, all animals were **re-exposed to the context paired with the shock** (shock chamber without receiving shock) for 15 min and blood samples were taken immediately after context exposure. One day later, animals were sampled under basal conditions to study resting levels.

DESIGN

In experiment 1 (**FIGURE 1**) we demonstrated that three shocks were able to induce behavioural and endocrine contextual fear conditioning as well as hypoactivity to unknown environments not paired with shock exposure. Thus, in experiment 2 (**FIGURE 2**) we wanted to determine whether the hypoactivity in unknown environments was developed when using a procedure not able to induce either contextual fear conditioning (immediate shock, Fanselow, 1990) or long-lasting electrophysiological hippocampal potentiation (Sacchetti et al., 2001).

In addition, we wanted to study whether the hypoactivity was related to the development of anxiety-like behaviour (in the EPM). Finally we also evaluated the possible generalization of freezing to a context similar to the shock chamber (a plexiglas cylinder).

EXPERIMENT 2

After the last day of handling, rats were randomly assigned to three groups: **(a) control** (n = 10), **(b) immediate shock** (1 shock group) (n = 9) and **(c) shock with 3 min pre-exposure** (3 min + 1 shock group) (n = 7). Shocked animals received only one shock (1.5 mA, 3 s of duration), being the difference that the 1shock group was immediately shocked (did not have pre-exposure to the context); whereas the standard 3 min + 1 shock group was allowed to explore the chamber 3 min before the shock. The control group was exposed to the chamber the same time without receiving shock. Six, seven and eight days after shock all animals were exposed to a **ROF**, an **EPM** and a **cylinder** on consecutive days.

The procedures lasted 15 min and blood samples were taken after the end of the test. A black curtain surrounded all tests and a red bulb was placed above the centre of the apparatus.

All **behavioural tests** were placed in a different room from those used in the stress session. The researcher and the box used to move the rats were also changed. The next day, 9 days post-stress, all animals were **re-exposed to the context** (shock chamber without receiving shock) for 15 min and blood samples were taken immediately after context exposure. One day later, animals were sampled under basal conditions to study resting levels.

DESIGN

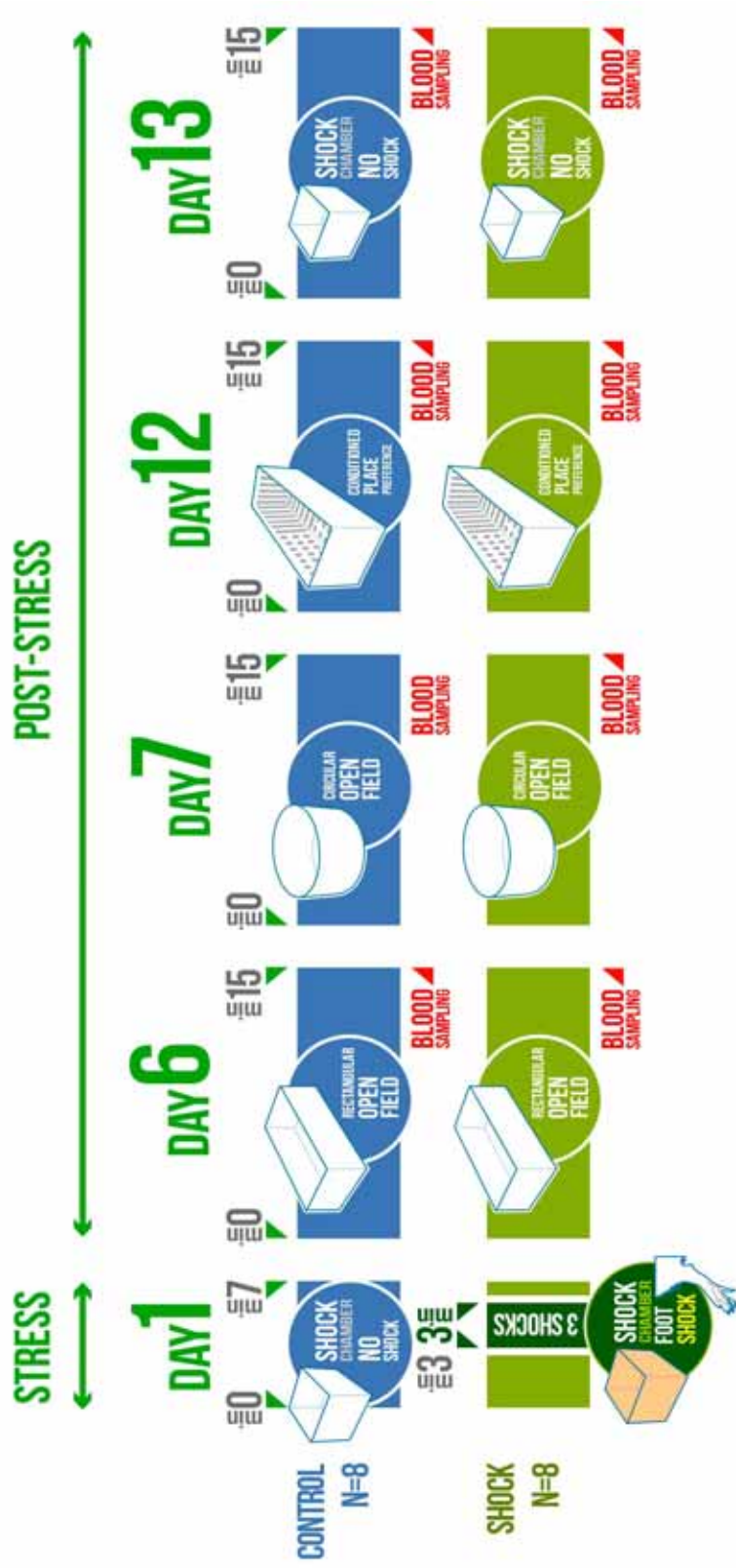


FIGURE 1. AN OUTLINE OF EXPERIMENT 1 (see the text for details)

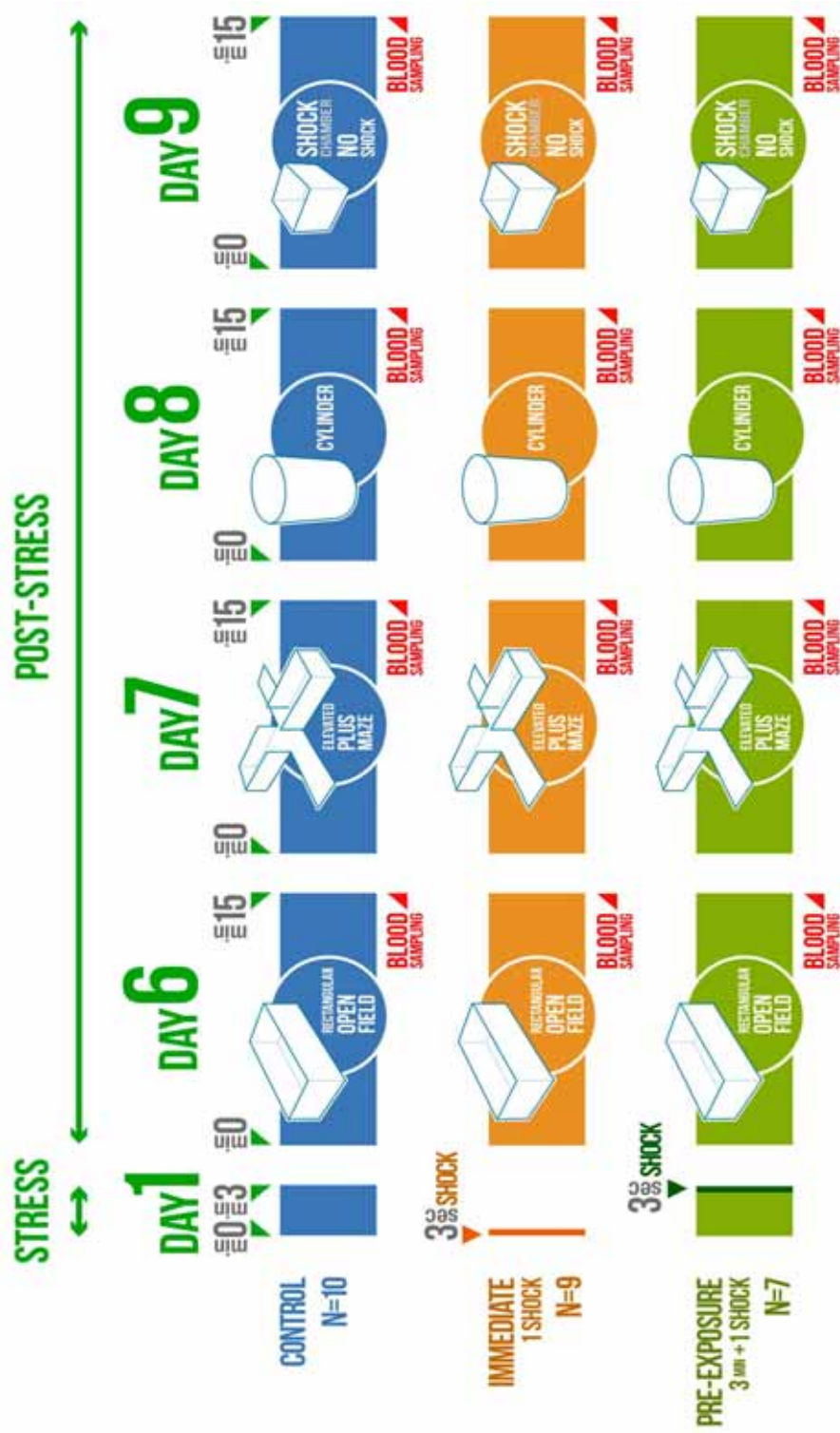


FIGURE 2. AN OUTLINE OF EXPERIMENT 2 (see the text for details)

UNKNOWN ENVIRONMENTS

Five different unknown environments were used (**ROF**, **COF**, **CPP**, **EPM** and a **cylinder**). They were always cleaned carefully between animals with a tap water solution containing ethanol (5% v/v). All the behavioural tests were illuminated by red bulbs placed 150 cm above the centre of the apparatus (0.2 lux).

The **ROF** was a grey rectangular plastic cage (56 x 36.5 x 31 cm). The **COF** was a white wooden circular arena (80 cm diameter x 34 cm high) with a black floor. The **CPP** apparatus consisted of a rectangular cage with two compartments (each 36.5 x 42 x 34.5 cm), having distinct visual and tactile cues. One compartment had wooden stripped black and white walls with the floor wood made, black and smooth. The other compartment had wooden white walls with black dots and the floor was glass-made, white and rough. A clear plexiglas **cylinder** (20 cm diameter x 30 cm high) was also used as a unknown environment. The animal was always placed into the different apparatuses facing the wall.

The **EPM**, adapted from Pellow and File (1986) consisted of four white wooden arms (formica) at right angles to each other, connected to a central square (10 cm²) to form the shape of a plus sign and elevated 50 cm above the floor. Each arm was 46 cm long and 10 cm wide. Two of the opposite arms had high walls (enclosed arms, 43 cm high), whereas the other two were the open arms that had a 0.7 cm ridge to provide an additional grip. The rat was placed facing a closed arm and the subject was considered to be in a given arm when all paws were inside.

The cage-mates were tested simultaneously in the same room in two different apparatuses, except in the EPM where the two cagemates were tested simultaneously in separate adjacent rooms.

BEHAVIOURAL ANALYSIS

In the shock chamber and the cylinder, behaviour was videotaped from the front by means of a camera situated 50 cm away from the apparatus. An experimenter blind to the treatment measured freezing behaviour by means of a stop watch.

Freezing involved the absence of all movement, except for respiratory-related movements, while the animal was in the stereotyped crouching posture

(Blanchard & Blanchard, 1969). Freezing is readily distinguished from resting by the crouching posture and by the fact that rats never lie down when they are freezing. Although freezing occurred most often in a characteristic sitting posture it was also possible to occur in a rearing posture.

In all the other cases, behaviour was videotaped from the top by means of a camera situated 150 cm above the centre of the apparatus. In all cases a Sony SSC-M388 CE, BW video camera was used. A digital video recorder (JVC VR-716) sampled the position of the rat (8.3 samples/s) and it was used to transfer the videos to a computer for subsequent manual analysis (EPM) or video tracking analysis using the centre of gravity of the animal (Smart version 2.5.19, Panlab, S.L.U, Barcelona, Spain).

A blind experimenter to the treatment measured from tracks, as a measure of hypoactivity, the distance travelled in the ROF, the COF and the CPP. In the EPM, time spent in open and closed arms, latency to the first open arm entry and numbers of entries in each type of arm were measured by a stop watch.

BIOCHEMICAL ASSAYS

Plasma ACTH was determined by double-antibody radio-immunoassay (RIA) as previously described (Márquez, Nadal, & Armario, 2004). Briefly, the RIA used ¹²⁵I-ACTH (PerkinElmer Life Science, Boston) as the tracer, rat synthetic ACTH 1-39 (Sigma, Barcelona, Spain) as the standard and an antibody raised against rat ACTH (rb 7) kindly provided by Dr. W.C. England (Department of Surgery, University of Minnesota, Minneapolis, USA). All samples were processed in the same assay to avoid inter-assay variability. The intra-assay coefficient of variation was of 6% and the sensitivity was of 25 pg/ml.

STATISTICAL ANALYSIS

Data were analyzed by the Statistical Program for Social Sciences (SPSS), version 15. In experiment 1, ACTH response to the different tests was studied by separate Student's t-test (GROUP: control and shock groups).

In experiment 2, to analyze behavioural and hormonal data in one single-point, a generalized linear model (GENLIN) was applied (McCulloch & Searle, 2001) with one between-subject factor (GROUP: control, 1 shock and

3 min + 1 shock groups) followed if needed by sequential Bonferroni post hoc tests (Holm, 1979).

In both experiments, a generalized estimating equations model (GEE) was used to analyze repeated-measures data (Hardin & Hilbe, 2003), with one or two within-subject factors (BLOCK: three periods of 5 min, and TEST: the different unknown environments) and one between-subject factor (GROUP, with two or three levels in function of the experiment). If a statistical significant interaction was found, additional pairwise comparisons were made. In experiment 2, post hoc analyses were made by means of sequential Bonferroni tests.

As a method of estimation, the maximum likelihood (ML) was used in all cases. Normality distribution and identity as a link function was always used. The significance of the effects was determined by the Wald chi-square statistic. Goodness of fit values (Akaike's information criterion, AIC, for GENLIN and Quasi Likelihood under independence model criterion, QIC, for GEE) were used to compare different models.

The generalized linear model is a more flexible statistical tool than the standard general linear model (GLM) because several types of distribution and different covariance structures of the repeated-measures data could be chosen.

RESULTS

EXPERIMENT 1

DISTANCE TRAVELLED in the different unknown environments is represented in **FIGURE 3**. Statistical analysis showed that group, test and block factors were all statistically significant [Wald χ^2 (1) = 4.99, $p < 0.05$; Wald χ^2 (2) = 55.78, $p < 0.001$; Wald χ^2 (2) = 92.10, $p < 0.001$ respectively], as were the interactions group x block [Wald χ^2 (2) = 14.32, $p < 0.001$] and test x block [Wald χ^2 (4) = 56.71, $p < 0.001$].

All the other interactions were not statistically significant. The decomposition of the interaction group x block revealed that ***regardless of the unknown environment, the hypoactivity produced by the previous exposure to the shock was only statistically significant at the beginning of the test*** (first block: group effect $p < 0.01$).

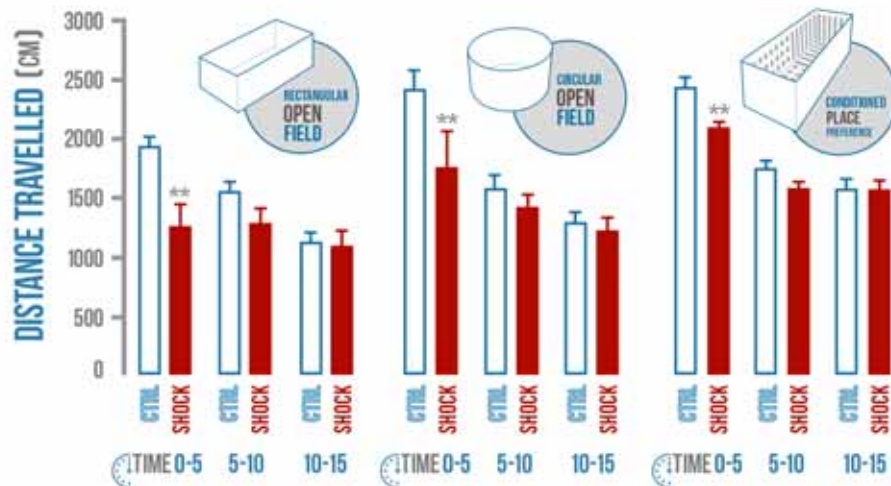


FIGURE 3. TOTAL DISTANCE TRAVELLED during 15 min (divided into 5 min time blocks) of exposure to the rectangular open field (ROF), the circular open field (COF) and the conditioned place preference apparatus (CPP) in control (n = 8) and in shocked (n = 8) rats. The latter were previously exposed, 6–12 days before, to three shocks (3 min of habituation to the shock chamber, 1.5 mA, 3 s, ITI 60 s).

***p < 0.01 vs. control group after decomposition of group x block interaction, regardless of test. Means and S.E.M. are shown.*

During the re-exposure to the shock chamber (**FIGURE 4**), the statistical analysis indicated that the previous shock treatment increased **FREEZING BEHAVIOUR** across the three blocks of 5 min of exposure [group: Wald χ^2 (1) = 55.12, $p < 0.001$; block: NS; group x block: Wald χ^2 (2) = 23.49, $p < 0.001$; after the decomposition of the interaction the group effect was $p < 0.001$ in all blocks]. **Thus, from a behavioural point of view, a contextual fear conditioning was developed.**

Regarding **ACTH RESPONSE**, the t-test for each environment showed (**FIGURE 5**) that previously exposure to the shock increased the hormonal response to the shock chamber [t (14) = 4.12, $p = 0.001$], but not the other unknown environments (ROF, COF and CPP). In all cases, the ACTH response to the tests was higher than basal levels ($p < 0.001$ in all cases). These data revealed that the previous exposure to the shock only increased ACTH levels in response to the environment previously associated with the shock but not in response to other environments.

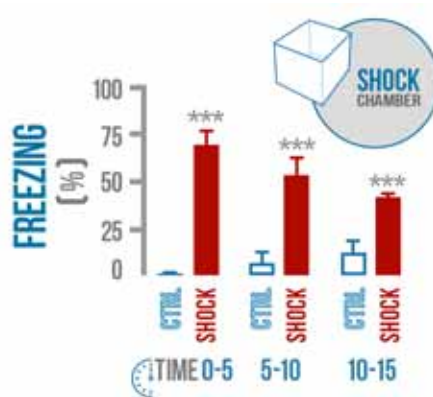


FIGURE 4. PERCENT TIME SPENT FREEZING IN THE SHOCK CHAMBER in control (n = 8) and in shocked (n = 8) rats, 13 days before.

*** $p < 0.001$ vs. control group after decomposition of group \times block interaction. Means and S.E.M. are shown.

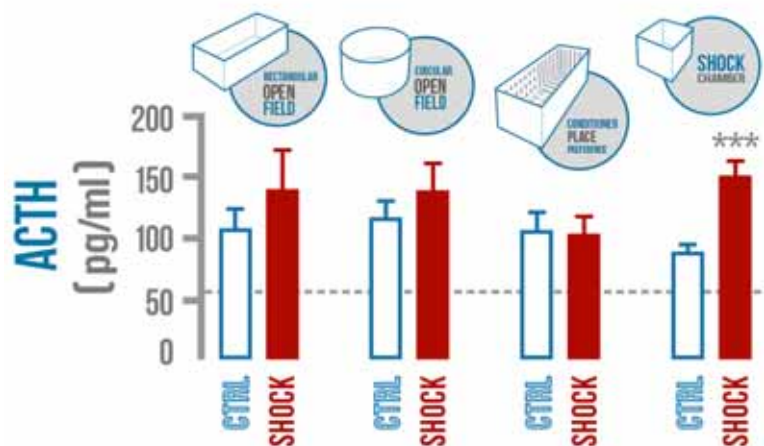


FIGURE 5. PLASMA ACTH LEVELS AFTER 15 MIN OF EXPOSURE TO DIFFERENT ENVIRONMENTS the rectangular open field (ROF), the circular open field (COF), the conditioned place preference apparatus (CPP) and the shock chamber in control (n = 8) and in shocked (n = 8) rats, 6–12 days before. The ROF, the COF and the CPP environments were not previously paired with shock exposure.

*** $p < 0.001$ vs. control group. The dotted line indicated resting levels obtained in a different day. Means and S.E.M. are shown.

Thus, according to behavioural results, **a conditioned increase in ACTH levels was found after shock chamber exposure**. Plasma corticosterone levels were also measured and the results were very similar to those of ACTH (data not shown).

EXPERIMENT 2

Analysis of the **DISTANCE TRAVELLED** in the ROF (**FIGURE 6**) showed that group and block factors were statistically significant [Wald χ^2 (2) = 7.70, $p < 0.05$; Wald χ^2 (2) = 38.33, $p < 0.001$ respectively], as was the interaction group x block [Wald χ^2 (4) = 40.17, $p < 0.001$]. The decomposition of the interaction group x bloc revealed that **the 3 min + 1 shock group in comparison to the other two groups showed hypoactivity in the unknown environment at the beginning of the test** (first block, $p < 0.001$ in both comparisons).

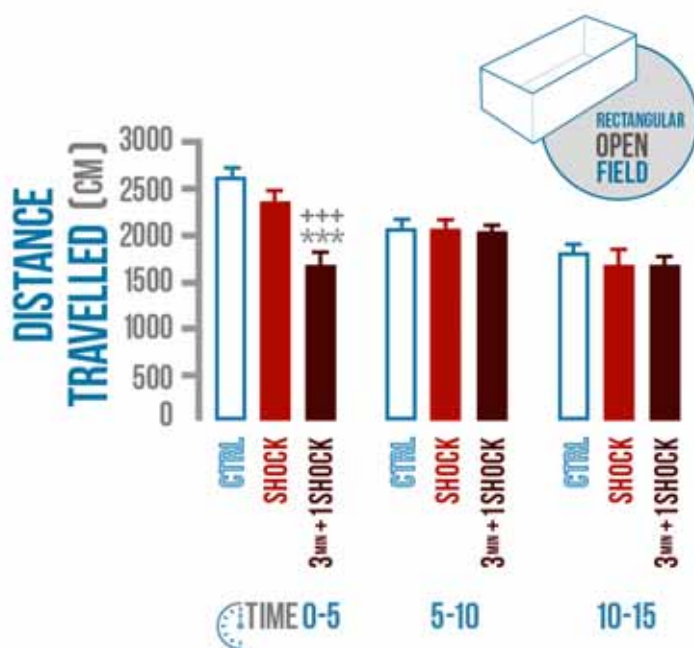


FIGURE 6. TOTAL DISTANCE TRAVELLED during 15 min (divided into 5 min time blocks) of exposure to the rectangular open field (ROF) in control rats ($n = 10$), in 1 shock rats ($n = 9$) and in 3 min + 1 shock rats. ($n = 7$) The shock groups were exposed 6 days before to 1 shock (1.5 mA, 3 s) immediately after entering the shock chamber (1 shock group) or after 3 min of habituation to the chamber (3 min + 1 shock).

*** $p < 0.001$ vs. control group, +++ $p < 0.001$ vs. 1 shock group.

Means and S.E.M. are shown.

FIGURE 7 showed the **BEHAVIOURAL EPM** data. The statistical analysis showed that the group factor was not statistically significant for open arm entries and time spent in open arms, being the block factor the only statistically significant [Wald $\chi^2(2) = 25.55$, $p < 0.001$; Wald $\chi^2(2) = 30.37$, $p < 0.001$ respectively].

However, for closed arms entries, group and block factors were all statistically significant [Wald $\chi^2(2) = 6.51$, $p < 0.05$; Wald $\chi^2(2) = 11.85$, $p < 0.01$ respectively], as was the interaction group x block [Wald $\chi^2(4) = 16.14$, $p < 0.01$]. The decomposition of the interaction revealed that ***only the 3 min + 1 shock group in comparison to the control group showed a significant hypoactivity in the two first blocks of the test*** (see **FIGURE 7** for significance).

FREEZING BEHAVIOUR inside the cylinder is represented in **FIGURE 8**. Group and block factors were all statistically significant [Wald $\chi^2(2) = 11.92$, $p < 0.01$; Wald $\chi^2(2) = 93.77$, $p < 0.001$ respectively], whereas the interaction group x block was not. Contrast analysis showed that ***the 3 min + 1 shock group showed more freezing in the unknown environment than the control group*** ($p < 0.01$).

During the re-exposure to the shock chamber, the statistical analysis of freezing behaviour (**FIGURE 8**) indicated that the group factor was statistically significant [Wald $\chi^2(2) = 12.40$, $p < 0.01$], but not block and group x block. Contrast analysis showed that ***the 3 min + 1 shock group had in all the session more freezing than the other two groups*** [$p < 0.001$ in both cases].

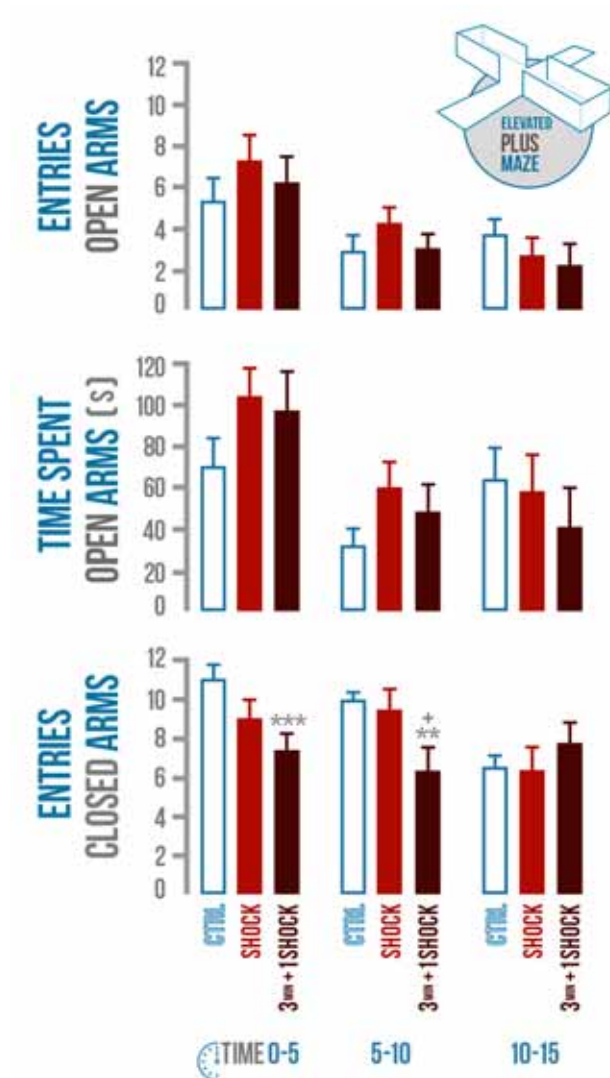


FIGURE 7. REPRESENTATIVE BEHAVIOURAL MEASURES during 15 min (divided into 5 min time blocks) in the elevated plus-maze, assessing open arms entries, time in open arms and closed arms entries in control rats (n = 10), in 1 shock rats (n = 9) and in 3 min + 1 shock rats (n = 7). The shock groups were exposed 7 days before to 1 shock (1.5 mA, 3 s) immediately after entering the shock chamber (1 shock group) or after 3 min of habituation to the chamber (3 min + 1 shock).

****p < 0.01 and p < 0.001 vs. control group, +p < 0.05 vs. 1 shock group.*

Means and S.E.M. are shown.

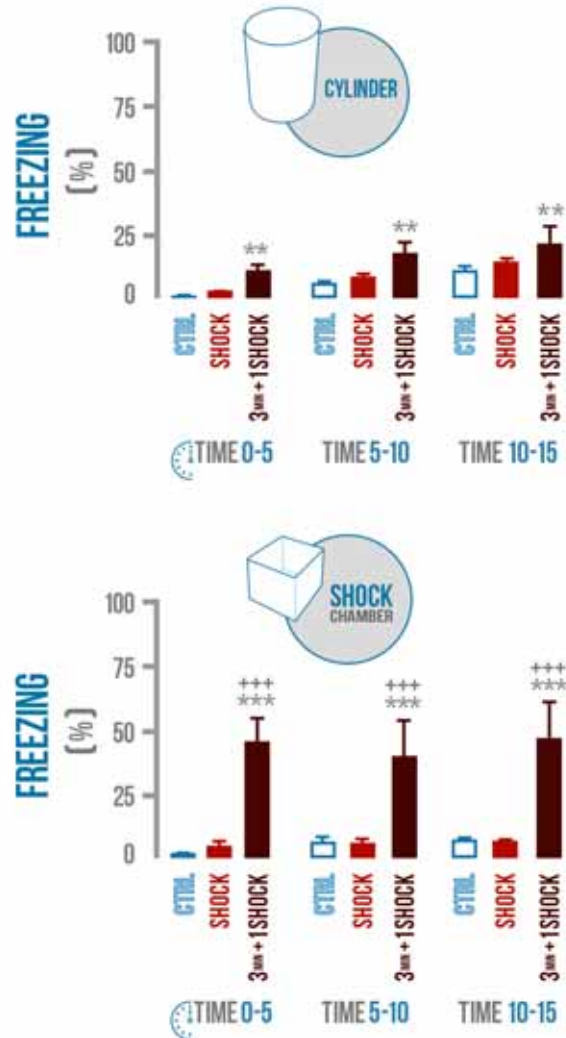


FIGURE 8. PERCENT TIME SPENT FREEZING IN A CYLINDER AND IN THE SHOCK CHAMBER during 15 min (divided into 5 min time blocks) in control rats ($n = 10$), in 1shock rats ($n = 9$) and in 3 min + 1 shock rats ($n = 7$). The shock groups were exposed 7–9 days before to 1 shock (1.5 mA, 3 s) immediately after entering the shock chamber (1 shock group) or after 3 min of habituation to the chamber (3 min + 1 shock). The cylinder was not previously paired with shock.

**** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. control group, +++ $p < 0.001$ vs. 1 shock group. Means and S.E.M. are shown.**

Regarding the **ACTH RESPONSE** to the test (**FIGURE 9**), the statistical analysis showed that the group factor was statistically significant only in the shock chamber (Wald $\chi^2(1) = 19.74$, $p < 0.001$, contrast analysis: 3 min + 1 shock showed more ACTH than the other two groups, $p < 0.001$ in both cases). In all cases, the ACTH response to the tests was higher than basal levels ($p < 0.001$ in all cases).

Thus, *previous exposure to the shock only enhanced ACTH response to the environment previously associated with the shock and not to other environments (ROF, EPM and cylinder).*

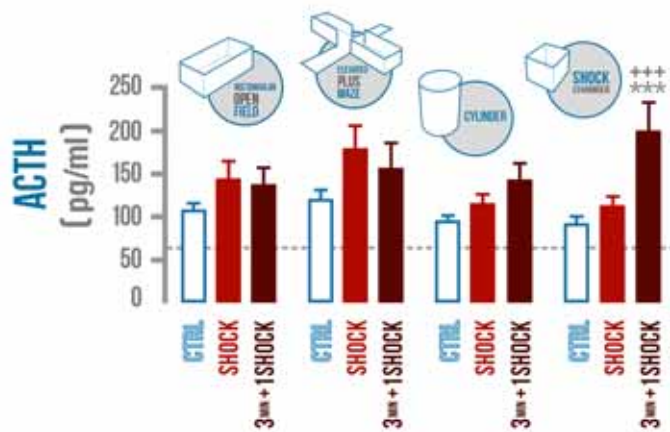


FIGURE 9. PLASMA ACTH LEVELS AFTER 15 MIN OF EXPOSURE TO DIFFERENT ENVIRONMENTS the rectangular open field (ROF), the elevated plus-maze (EPM), the cylinder and the shock chamber in control rats ($n = 10$), in 1 shock rats ($n = 9$) and in 3 min + 1 shock rats ($n = 7$). The shock groups were exposed 6–9 days before to 1 shock (1.5 mA, 3 s) immediately after entering the shock chamber (1 shock group) or after 3 min of habituation to the chamber (3 min + 1 shock). The ROF, the EPM and the cylinder were not previously paired with shock exposure.

*** $p < 0.001$ vs control group, +++ $p < 0.001$ vs 1 shock group. The dotted line indicated resting levels. Means and S.E.M. are shown.

DISCUSSION

The present results confirmed some previous reports in those animals exposed to a relatively brief session of shock developed long-lasting (6–12 days) hypoactivity upon exposure to unknown environments. More importantly, such *hypoactivity did not extinguish during successive exposures to different unknown environments* and *was not accompanied by enhanced HPA responsiveness*, which did appropriately reflect fear of the shock environment. Finally, *hypoactivity in unknown environments is dependent on the development of foreground (unsigned) contextual fear conditioning* suggesting some kind of learned generalization that unknown environments are potentially dangerous.

In accordance with previous reports by Tilders' group and other labs (Van den Berg et al., 1998; Van Dijken, Mos, et al., 1992; Van Dijken, Van der Heyden, et al., 1992; Van Dijken et al., 1993), a single session of three shocks was sufficient to induce a long-lasting hypoactivity in unknown environments. Such hypoactivity was maintained when the same animals were exposed on different days to different unknown environments: a ROF, a COF and a CPP apparatus. Interestingly, despite the fact that the effects of shock were only observed during the first 5 min of exposure to each unknown environment, this pattern was maintained in response to each of the three environments. This suggests that within session extinction did not further affect the response to other different unknown environments. In order to know if hypoactivity was related to an enhanced emotional response of shock-exposed rats to the unknown environments we measured ACTH response after each 15 min session. Activation of the HPA axis has been consistently found to reflect the intensity of emotional stressors (see for a review Armario, 2006) and fear conditioning (Merino et al., 2000; Muñoz-Abellán et al., 2009; Van de Kar et al., 1991). ACTH responses to the unknown environments did not differ in shock-exposed as compared to control rats. In contrast, in the former animals, a greater HPA response to the shock context was observed that paralleled the enhanced fear (freezing). These results suggest that hypoactivity in unknown environments is not linked to a marked increase in fear.

In a second experiment we found that a single shock given 3 min after exposure of the rats to the shock chamber was enough to induce foreground contextual fear conditioning as evaluated by the levels of freezing to the context 9

days later. In contrast, those rats receiving the shock immediately after exposure to the apparatus did not acquire this one-trial contextual fear conditioning, as assessed by freezing. Rats preexposed to the context developed hypoactivity in unknown environments, whereas those immediately shocked did not.

Therefore, our results indicate that even a single shock is able to induce long-lasting hypoactivity in unknown environments and, collectively, they confirmed previous results by Radulovic et al. (1998) in that shock-induced hypoactivity in unknown environments is linked to the proper development of contextual fear conditioning.

We extended those findings in two important aspects: first, we demonstrated that the effects were very long-lasting; and second, we studied the concomitant physiological response (HPA axis) to the shock chamber and the unknown environments to have an additional measure of fear. A higher ACTH response to the shock context was observed in the standard group (allowed to explore the context before the shock), whereas such enhanced response was not found in the immediately shocked group, thus paralleling freezing results.

Why animals previously exposed to a single or a brief session of shock develop hypoactivity upon exposure to unknown environments? Kamprath and Wotjak (2004) have demonstrated in mice that a single shock exposure can induce a generalized potentiation of the response to sensorial stimuli (sensitization) that resulted in increased fear responsiveness to aversive stimuli. However, in our conditions, non-specific shock-induced fear sensitization is unlikely so far as hypoactivity was linked to development of contextual fear conditioning. A second possibility is that animals exposed to an unknown environment where they have an aversive experience under conditions that allow them to associate the aversive experience with such environment could learn that any unknown environment may be potentially dangerous. Consequently, in these situations, animals would adopt a more cautious behaviour. The finding that EPM behaviour was not altered is in accordance with a previous report (Radulovic et al., 1998) and argues against the possibility that shock exposure would have resulted in an increase in the type of anxiety that can be detected with this test. The apparent paradox that the group of shocked rats that developed contextual fear conditioning showed reduced number of entries in the closed arms of the EPM can be explained by avoidance of the closed arms that resemble more the reduced space of the shock chamber than the open arms.

In any case, the impact of shock experience would not be so intense to generate an important level of fear and this could explain the normal HPA activation observed in shock as compared to control rats in the unknown environments. Since the possibility remained that freezing was not observed in the unknown environments because the markedly different size of these environments as compared to the shock chamber, animals were also tested in a reduced size enclosure (a clear plexiglas cylinder). We found higher levels of freezing in the group preexposed to the context indicating that some kind of generalization was developed, in agreement with previous data using high intensity shocks (Baldi, Lorenzini, & Bucherelli, 2004). Nevertheless, levels of freezing in the cylinder were much lower than those in the shock chamber.

Thus, a single shock may itself induce a weak generalization of fear to different unknown environments if they could associate shock exposure to a particular context, but this generalization was not enough to induce activation of the HPA axis after cylinder exposure as did the shock context.

The hypothesis that hypoactivity is the result of a low level of fear in the unknown environments is compatible with the results reported by Laxmi, Stork, and Pape (2003), in mice. The authors found, using auditory cued fear conditioning, that exposure to the conditioned stimulus elicited only hypoactivity but not freezing when shock intensity was low (0.2 mA), whereas with higher shock intensity (i.e. 0.4 mA) freezing predominated. That is, low levels of fear may result in hypoactivity and higher levels of fear in freezing.

Taken together, our data and those of other authors suggest that *exposure to a single or a few footshocks appears to have several different long-lasting consequences*: first, **development of contextual fear conditioning**; second, **generalization of fear to other unrelated environments**; and third, **non-specific sensitization**. Such effects are not however enough to induce long-lasting changes in trait-anxiety, although this assertion did not preclude that longer-lasting sessions of shock could be able to induce more dramatic behavioural changes reflected in an enhanced anxiety, particularly if vulnerable animals are used. In addition, the present results add important data to the interpretation of long-lasting effects of brief session of shocks by ruling out a non-specific sensitization of the HPA responsiveness to stressors and demonstrating that generalization of fear to unknown environments, if any, was not of enough intensity to be reflected in a greater HPA activation than that observed in shock-naive rats. On the basis of our results we would like to intro-

duce some caution to the interpretation of these changes as a reflection of the traumatic nature of a single shock, which bears implications for the development of appropriate animal models of PTSD.

In conclusion, even a single shock can induce long-lasting changes in behaviour of animals during exposure to unknown environments (hypoactivity) that appears to be dependent on the development of contextual fear conditioning. Hypoactivity could be interpreted as reflecting a weak generalization of fear to any unknown environment that is not enough to cause activation of the HPA axis as it does the exposure to the shock context. The development of contextual fear conditioning and hypoactivity to unknown environments is not accompanied by an increase in anxiety-like behaviour as measured by the EPM, suggesting that shock exposure did not enhanced generalized anxiety.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-01175), Instituto de Salud Carlos III (RD06/ 0001/0015, Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud, Ministerio de Sanidad y Consumo), Plan Nacional sobre Drogas and Generalitat de Catalunya (SGR2009-16). ND is a recipient of a fellowship from Ministerio de Educación y Ciencia.

CAPÍTULO 2

**NOT ALL STRESSORS ARE EQUAL:
BEHAVIORAL AND ENDOCRINE
EVIDENCE FOR DEVELOPMENT
OF CONTEXTUAL FEAR
CONDITIONING
AFTER A SINGLE SESSION OF FOOTSHOCKS
BUT NOT OF IMMOBILIZATION**

**NÚRIA DAVIU
RAÚL DELGADO-MORALES
ROSER NADAL
ANTONIO ARMARIO**

FRONTIERS IN BEHAVIORAL NEUROSCIENCE 6 (2012) 69

KEYWORDS

CONTEXTUAL FEAR CONDITIONING, HYPOTHALAMIC-PITUITARY-ADRENAL AXIS
STRESS, FOOTSHOCK, IMMOBILIZATION, FREEZING

ABSTRACT

EXPOSURE OF ANIMALS TO FOOTSHOCKS (FS) IN ABSENCE OF ANY SPECIFIC CUE RESULTS IN THE DEVELOPMENT OF FEAR TO THE COMPARTMENT where shocks were given (contextual fear conditioning), and this is usually evaluated by time spent freezing.

However, the extent to which contextual fear conditioning always develops when animals are exposed to other stressors is not known. In the present work we firstly demonstrated, using freezing, that exposure of adult rats to a single session of FS resulted in short-term and long-term contextual fear conditioning (freezing) that was paralleled by increased hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) activation.

In contrast, using a similar design, no HPA or behavioral evidence for such conditioning was found after exposure to immobilization on boards (IMO), despite this stressor being of similar severity as FS on the basis of standard physiological measures of stress, including HPA activation.

In a final experiment we directly compared the exposure to the two stressors in the same type of context and tested for the development of conditioning to the context and to a specific cue for IMO (the board). We observed the expected high levels of freezing and the conditioned HPA activation after FS, but not after IMO, regardless of the presence of the board during testing.

Therefore, it can be concluded that development of fear conditioning to context or particular cues, as evaluated by either behavioral or endocrine measures, appears to be dependent on the nature of the aversive stimuli, likely to be related to biologically preparedness to establish specific associations.

INTRODUCTION

WHEN RATS OR MICE ARE EXPOSED TO AN AVERSIVE STIMULUS SUCH AS FOOT-SHOCKS (FS) IN A SPECIFIC COMPARTMENT, the animals develop fear to the place where shocks were given and this has been termed contextual fear conditioning. If additional cues that predict shocks are given (tone or light), the animals also develop cue-fear conditioning, but still maintain a certain level of contextual fear conditioning (i.e., Maren et al., 1994). By classical (pavlovian) conditioning, pairing of an initially neutral stimulus (a particular environment or specific cues) with an aversive (unconditioned stimulus, US) resulted in the development of a conditioned response (CR) to the mere presentation of the previously neutral stimulus (conditioned stimuli, CS).

Cue and contextual fear conditioning has been for decades the typical paradigm for the study of factors and neurobiological mechanisms involved in aversive learning processes. Cue and context fear conditioning can develop, under appropriate conditions, even after a single shock (i.e., Fanselow, 1980; Rudy, 1993), thus demonstrating a strong biological predisposition to this type of learning. Ample evidence has been obtained for a critical role of stress-induced glucocorticoid release in the development of emotional memory and shock-induced fear conditioning (Sandi and Pinelo-Nava, 2007). More specifically, it appears that activation of glucocorticoid receptors (GR) in the basolateral nucleus of the amygdala is critical for β -adrenergic receptors in this area to potentiate emotional memory (de Quervain et al., 2009).

FS-induced fear conditioning is usually evaluated by time spent freezing after exposure to the CS. However, there is evidence that exposure to the CS can also elicit, depending on the experimental conditions, other types of behaviours, including avoidance, hypo-activity, risk assessment, suppression of ongoing operant behaviour or fear-potentiated startle response (i.e., Davis, 1990; Radulovic et al., 1998; Antoniadis and McDonald, 1999; Laxmi et al., 2003). In addition to behaviour, physiological parameters such as plasma levels of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) hormones can also be useful as makers of fear conditioning (see Armario et al., 2012 for review). In addition to their paramount importance in the study of emotional learning, procedures involving FS are also widely used in animal models for psychopathology, on the assumption that excessive response to shocks and corresponding

enduring memory about the situation can give us some clues about the bases for the development of pathological anxiety, including posttraumatic stress disorder (PTSD) (Rau et al., 2005). In fact, it has been observed that under certain conditions, exposure to FS also resulted in long-lasting alterations of behaviour in novel environments. More specifically, shock-exposed animals develop hypoactivity in environments not previously associated to shock (i.e., van Dijken et al., 1992a, b; Van den Berg et al., 1998), although this is difficult to interpret in terms of enhanced anxiety-like behaviour (Radulovic et al., 1998; Kamprath and Wotjak, 2004; Daviu et al., 2010). Interestingly, hypoactivity in novel environments appears to be associated to the development of shock-induced contextual fear conditioning (Radulovic et al., 1998; Daviu et al., 2010), suggesting some kind of generalization of fear/anxiety to environments completely unrelated to that in which the animals received the shocks.

In recent years, another stress paradigm, exposure to cat odour, has been developed that also results in contextual/cue (a cloth or piece impregnated with the odour) fear conditioning. This is reflected in behavioural inhibition, immobility, and avoidance of the odour-associated cue (Dielenberg et al., 1999, 2001; McGregor and Dielenberg, 1999; Blanchard et al., 2001, 2003; Takahashi et al., 2008; Muñoz-Abellán et al., 2009), together with activation of the HPA axis and the sympathetic system (Dielenberg et al., 2001; Muñoz-Abellán et al., 2009), when animals are again exposed days later to the same context of odour exposure. Interestingly, a single exposure of rats or mice to a cat (predator) or to cat's odours is able to induce long-lasting increases in anxiety-like behaviour, as evaluated by the elevated-plus maze (EPM) and the acoustic startle response (ASR) (i.e., Adamec and Shallow, 1993; Cohen et al., 2003; Muñoz-Abellán et al., 2008).

The above data indicate that FS and predator odour are able to induce long-lasting contextual fear conditioning, but also long-lasting changes in behaviour of animals in novel environments. In contrast, exposure to two stressors considered of high intensity on the basis of the physiological changes they elicit, immobilization on boards (IMO) or a prolonged session of inescapable electric tail-shocks typical of the learned helplessness paradigm (IS-LH) (Maier et al., 1986; Fleshner et al., 1995; Vallès et al., 2000; Márquez et al., 2002), has been found to induce important behavioural changes for a few days after the stressors, but most changes apparently vanished after 1 week (i.e., Maier, 1984; Reinstein et al., 1984; Belda et al., 2008).

AIMS

We have hypothesized that failure to find long-lasting changes in anxiety after exposure to these two severe stressors may be, at least in part, related to difficulties for animals to establish contextual fear conditioning to these particular stressors (Armario et al., 2008). However, to our knowledge, there is no report assessing whether or not contextual fear conditioning has developed with these two stressors. In fact, considering the absence of studies on fear conditioning with stressors other than FS or cat odour, it is unclear whether or not development of contextual fear conditioning is not a general property of aversive stimuli but a particular property of a restricted set of stressors. Thus, in the present work we studied in adult male rats possible differences between exposure to FS or IMO in a particular environment regarding the development of contextual fear conditioning. Our results indicate that contextual fear conditioning develops only after exposure to FS but not IMO, demonstrating that development of contextual fear conditioning in rats is not a universal property of all aversive stimuli that activate the HPA axis.

MATERIALS AND METHODS

ANIMALS AND GENERAL PROCEDURE

Two month old male Sprague–Dawley rats with the same characteristics as previously reported.

STRESS PROCEDURES

The stressors used were FS or IMO. Scramble shocks 1.5 mA, 3 s of duration were administered every 60 s. IMO rats were stressed by taping their four limbs to metal mounts attached to a board (García et al., 2000). Head movements were restricted with two plastic pieces (7 × 6 cm) placed in each side of the head and the body was subjected to the board by means of a piece of plastic cloth (10 cm wide) attached with Velcro that surrounded all the trunk.

APPARATUSES AND BEHAVIOURAL RECORDING

The small shock chambers of Experiment 1 were clear Plexiglas boxes (19.7 × 11.8 × 20.0 cm) with a metal removable grid floor of 15 stainless steel rods, 0.4 cm diameter and spaced 0.9 cm centre to centre (Cibertec, Madrid, Spain). The open-fields (OF) of the Experiment 2 were gray rectangular plastic (56 × 36.5 × 31 cm) boxes. The large shock chambers of Experiment 3 were clear Plexiglas boxes (57 × 41 × 70 cm) with a metal removable grid floor of 44 stainless steel rods, 0.4 cm diameter, spaced 1.5 cm centre to centre (Panlab S.L.U, Barcelona). The apparatuses were always cleaned carefully between animals with tap water solution containing ethanol (5%, v/v).

In **Experiment 1**, video cameras (Sony SSC-M388 CE, BW) were placed in front of the FS chamber and recorded the two cagemate animals simultaneously. In **Experiment 2**, cameras were suspended from the ceiling (1.20 m above the surface of the OF) and two OF were recorded simultaneously. Activity of the animals was evaluated in 5 min blocks by video-tracking using the centre of gravity of the animal (Smart version 2.5.19, Panlab S.L.U, Barcelona). In **Experiment 3**, one camera was placed in front of the chamber to assess freezing behaviour (by a stop-watch), and another camera was suspended from the ceiling to evaluate motor activity by video-tracking. The images were transferred to a JVC VR-716 digital video recorder. The video recorder sampled the position of the rat (8.3 samples/s) and was used to transfer the videos to a computer for subsequent analysis. An experimenter blind to the treatment measured activity or freezing. The latter behaviour involves the absence of all movement, except for respiratory-related movements.

STATISTICAL ASSAYS

Data were analyzed by the Statistical Program for Social Sciences (SPSS), version 17. Behavioural and hormonal response at a single-point was analyzed by means of a generalized linear model (GENLIN) (McCulloch and Searle, 2001). A generalized estimated equation model (GEE) was used to analyze repeated measures data (Hardin and Hilbe, 2003). The within and between-subjects factors used are indicated in each experiment. GENLIN and GEE models are more flexible statistical tool than the general linear model for the following reasons: (1) you can choose between several types of distribution of your data (normal, binomial, Poisson, gamma, or inverse-Gaussian), (2) you can run the analysis even if you have some missing data in your repeated measures data, (3) you do not need homogeneity of variance. In all cases, if a statistical significant interaction was found, additional pair-wise comparisons (Bonferroni sequential adjustment) were made. As a method of estimation, the maximum likelihood (ML) was used. Normality distribution and identity as a link function was always used. The significance of the effects was determined by the Wald chi-square statistic.

EXPERIMENTAL DESIGNS AND RESULTS

EXPERIMENT 1

The objective of the experiment was to **demonstrate that contextual fear conditioning immediately after the FS session may be reflected in both behavioural (freezing) and endocrine changes and that such conditioning would be maintained for days after FS.**

DESIGN

On day 1, all animals were initially exposed for 5 min to small shock chambers without receiving FS (pre-shock time 0–5). Then, treatments differed in function of the experimental group (see detailed procedure in **FIGURE 1**): **(1) control-home rats** (n = 5) were additionally maintained for 30 min in the FS chamber without FS; then, they were blood sampled (time 35) and moved to their regular home-cages in the animal room, being sampled again after an additional 30 min period (time R30); **(2) control-chamber rats** (n = 8) were additionally exposed for 30 min to the FS-chamber without FS, immediately sampled (time 35) and returned to the FS chamber for an additional 30 min period, after which they were sampled again (time R30); **(3) FS-home rats** (n = 8) were exposed for 25 min to 25 shocks in total (shock time 5–30), maintained for 5 min without shocks (post-shock time 30–35), sampled (time 35 min) and moved to their regular home-cages at the animal room for an additional 30 min period followed by sampling (time R30); and **(4) FS-chamber rats** (n = 8) were exposed for 25 min to FS (shock time 5–30), maintained for 5 min without shocks, sampled (post-shock time 35) and returned to the FS chamber for an additional 30 min shock-free period followed by sampling (post-shock time R30). The rationale to have “home” and “chamber” rats was to study whether rats that remained in the chamber after the shocks showed a slow hormonal recovery as a physiological measure of contextual fear conditioning.

Behaviour was recorded in the shock chamber for all groups during the 5 min pre-shock period (time 0–5) and for the control-chamber and FS chamber groups at the following times: post-shock time 30–35, immediately after sampling (time R 0–5), and during the last 5 min in the FS chamber, just before the second sampling (time R 25–30). On day 8 (retention), all rats were again exposed to the FS chamber for 5 min (without FS), to evaluate freezing as a measure of contextual fear conditioning.

The **statistical analysis** included two between-subjects factors: (1) SHOCK (control and shocked) and (2) POST-SHOCK CONDITION (home and chamber). When repeated measures were included in the analysis, the within-subjects factors were SAMPLING TIME (2 levels) for endocrine data or BLOCK (3 levels) for freezing data.

RESULTS

We first analyzed whether or not baseline **FREEZING** differed among the groups before FS (pre-shock time 0–5) and this analysis, revealed no group differences (**FIGURE 2**). Then, we analyzed whether post-shock freezing (time 30–35) differed in function of the experimental group. The analysis revealed, as expected, a significant effect of shock (Wald χ^2 (1) = 366.65, $p < 0.001$), but not of post-shock condition, thus demonstrating that the two shocked groups were homogeneous (**FIGURE 2**). After that, freezing behaviour of control-chamber and FS-chamber groups was compared over time. Statistical analysis revealed significant effects of shock (Wald χ^2 (1) = 148.04, $p < 0.001$), block (Wald χ^2 (2) = 20.47, $p < 0.001$) and the interaction block X time (Wald χ^2 (2) = 19.16, $p < 0.001$).

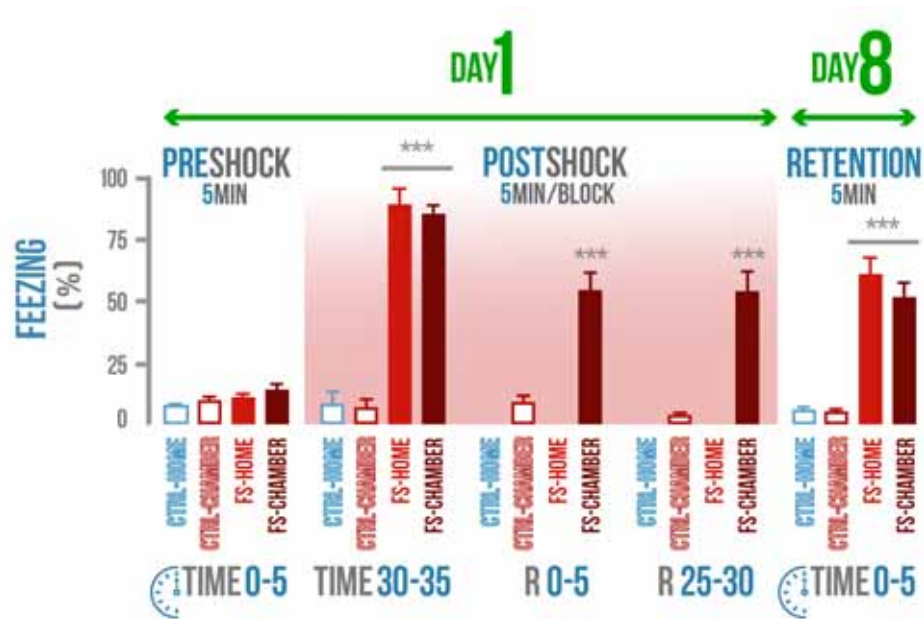


FIGURE 2. PERCENTAGE OF TIME SPENT FREEZING FOR EXPERIMENT 1 ON DAY 1 (PRE-SHOCK PERIOD AND SEVERAL POST-SHOCK PERIODS), AND DAY 8 (RETENTION). Means and SEM are represented.

The groups were as follows: control-home, not shocked during the 35 min exposure to the shock chamber and returned to the home-cage after that; control-chamber, not shocked during the 35 min in the chamber and maintained in the shock chamber for an additional period of 30 min (R 0–30); FS-home, shocked in the chamber and returned to their home-cages after that; FS chamber, shocked in the chamber and maintained in the shock chamber for an additional period of 30 min without shocks.

*** $p < 0.001$ vs. control groups.

Further analysis demonstrated high levels of freezing in FS group as compared to control group ($p < 0.001$), although a moderate decrease of freezing over time was observed in the two groups, but particularly in the FS group.

When exposed again to the FS chamber on day 8 for retention (**FIGURE 2**), the analysis of freezing behaviour revealed a significant effect of shock (Wald $\chi^2(1) = 120.12$, $p < 0.001$), but not post-shock condition, reflecting that levels of freezing were independent of whether or not, on day 1, the animals returned to their home-cages immediately after shocks.

PLASMA ACTH levels on day 1 were analyzed using shock and post-shock conditions as the between-subjects factors and sampling time as the within-subjects factor. As can be seen in **FIGURE 3**, the analysis revealed significant effects of shock (Wald $\chi^2(1) = 126.49$, $p < 0.001$), post-shock condition (Wald $\chi^2(1) = 6.52$, $p < 0.05$), sampling time (Wald $\chi^2(1) = 126.95$, $p < 0.001$) and the interactions shock \times sampling time (Wald $\chi^2(1) = 58.45$, $p < 0.001$), post-shock condition \times sampling time (Wald $\chi^2(1) = 19.00$, $p < 0.001$), and the second order interaction shock \times post-shock condition \times sampling time (Wald $\chi^2(1) = 5.918$, $p < 0.05$). Further analysis indicated that immediately after shocks, the two shocked groups showed high levels of ACTH as compared to the respective non-shocked groups ($p < 0.001$ in both cases), with no differences among the groups in function of the post-shock condition.

During the post-shock period (R30), the FS-home group showed higher levels than the control-home group ($p < 0.001$) and the highest levels were observed in the FS-chamber group that differed significantly from control-chamber ($p < 0.001$) and from FS-home group ($p < 0.01$). That is, during the post-shock period, the FS rats that were returned to their home-cages showed higher levels of ACTH than control-home rats, but ACTH levels were even higher in those FS rats maintained in the chamber after the shocks.

The analysis of **PLASMA CORTICOSTERONE** levels on day 1 (**FIGURE 3**) revealed significant effects of shock (Wald $\chi^2(1) = 178.74$, $p < 0.001$), sampling time (Wald $\chi^2(1) = 235.62$, $p < 0.001$) and the interactions shock \times sampling time (Wald $\chi^2(1) = 76.60$, $p < 0.001$) and post-shock condition \times sampling time (Wald $\chi^2(1) = 23.32$, $p < 0.001$). The decomposition of the interactions indicated that immediately after shocks, the two FS groups showed high levels of corticosterone as compared to the non-shocked groups ($p < 0.001$).

Moreover, at R30, significant effects of shock and post-shock conditions were found ($p < 0.001$ in the two cases), reflecting that animals previously exposed to shock showed higher corticosterone levels than non-shocked animals and that those maintained in the chamber showed higher levels than those that were returned to their home-cages.

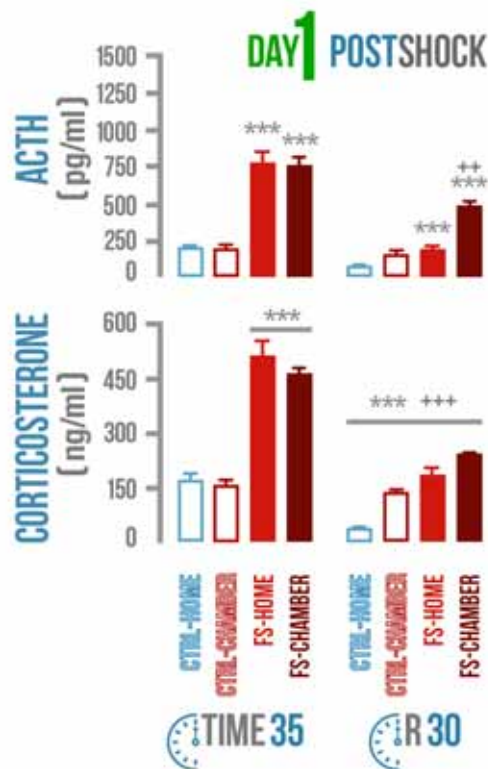


FIGURE 3. PLASMA ACTH AND CORTICOSTERONE LEVELS ON DAY 1 FOR EXPERIMENT 1. Means and SEM are represented. The groups were as follows: control-home, not shocked during the 35 min exposure to the shock chamber and returned to the home-cage after that; control-chamber, not shocked during the 35 min in the chamber and maintained in the shock chamber for an additional period of 30 min (R 0–30); FS-home, shocked in the chamber and returned to their home-cages after that; FS-chamber, shocked in the chamber and maintained in the shock chamber for an additional period of 30 min without shocks. Blood sampling was done in the post-shock period at times 35 and at R30.

*** $p < 0.001$ vs. control groups; ++, +++: $p < 0.01$ and $p < 0.001$ vs. corresponding home groups.

In Experiment 1, both FS groups showed a much higher activation of the HPA axis than controls as a consequence of FS. Interestingly, although plasma ACTH and corticosterone levels decreased in the two FS groups during the post-shock period, the FS-chamber group showed higher levels of ACTH than the FS-home group, demonstrating *that maintenance of FS animals in the FS chambers not only induced freezing, but also resulted in a more sustained activation of the HPA axis as compared to FS-home group*. When animals are exposed seven days later to the FS chamber, both FS groups showed high levels of freezing as compared to non-shocked groups, therefore, *the longer exposure to the context on day 1 had no effect on contextual fear conditioning* (measured by freezing).

EXPERIMENT 2

The previous experiment demonstrated that rats exposed to shocks showed clear evidence for contextual fear conditioning. We decided **to use an analogous design with IMO as the stressor**, although some changes were introduced in the protocol considering the specific characteristics of IMO and the expected results (**FIGURE 4**). First, **we did not include the control-home group** due to the low hormonal response observed in Experiment 1. Second, **an OF, much larger in size than the small shock chambers of Experiment 1, was chosen** as the small chambers were too small to accommodate the IMO boards. Third, due to the larger size of the OF, which may affect the expression of fear conditioning, **we measured both hypo-activity and freezing a putative measures of fear conditioning** (i.e., Radulovic et al., 1998; Laxmi et al., 2003). Moreover, to further corroborate behavioural measures, we also evaluated HPA function as a reflection of conditioning. This was based on our positive results in the preceding experiments with short-term conditioning and results from the literature that have demonstrated that HPA activation reflects fear conditioning (Van de Kar et al., 1991; Campeau et al., 1997; Merino et al., 2000; Muñoz-Abellán et al., 2009; Daviu et al., 2010).

Finally, a prolonged period of exposure to the OF during fear conditioning testing was chosen (15 min) because, in our hands, HPA activation consistently reflects fear conditioning when exposure to the context lasted for 15 min instead of the 5 min exposure typically used when only freezing is evaluated (Muñoz-Abellán et al., 2009; Daviu et al., 2010; Armario et al., 2012).

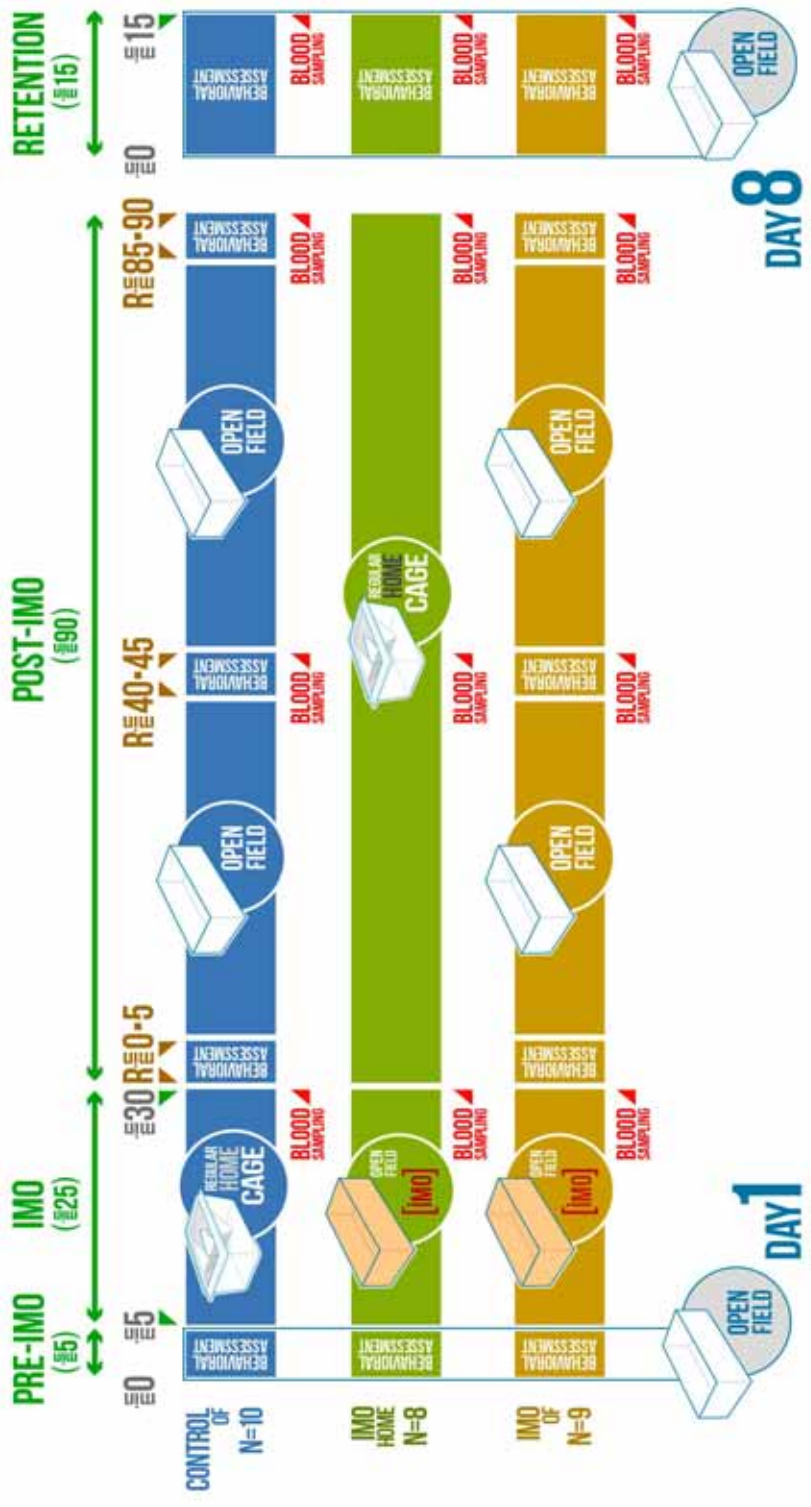


FIGURE 4. AN OUTLINE OF EXPERIMENT 2 (see the text for details)

DESIGN

On day 1, all rats were initially exposed for 5 min to the OF (pre-IMO time 0–5). After that, the treatment differed in function of the particular experimental group (FIGURE 4): (1) **control-OF** (n = 10) rats were returned to their regular cages in the animal room for 25 min (time 5–30), then sampled (time 30) and exposed again to the OF for 90 min; during this latter period rats were additionally sampled at 45 and 90 min (times R45 and R90); (2) **IMO-home** (n = 8) rats were immobilized for 25 min (IMO time 5–30) within the OF, then sampled (time 30) and returned to their regular cages in the animal room, being sampled again in the post-IMO period at R45 and R90; and (3) **IMO-OF** (n = 9) rats were immobilized for 25 min (time 5–30) within the OF; then, sampled (time 30) and returned again to the OF for 90 min, with additional sampling in the post-IMO period at R45 and R90 min. Control-OF rats were not maintained in the OF during the initial 25 min period when the other groups were exposed to IMO because prolonged exposure to the OF may progressively reduce activity/exploration as a consequence of habituation, whereas this was unlikely in IMO groups as the rats had not opportunity to explore the OF while immobilized.

Behaviour was recorded as follows: (1) in the three groups during the first 5 min in the OF (pre-IMO time 0–5); (2) in the control-OF and IMO-OF groups during the 5 min following the first blood sampling (post-IMO R 0–5) and during the 5 min preceding the second and the third blood sampling (post-IMO R 40–45 and R 85–90, respectively). Blood sampling times were changed with respect to Experiment 1 because IMO is characterized by a slower return of HPA hormones to pre-stress levels as compared to the FS (Márquez et al., 2002). On day 8 (retention), all animals were again exposed to the OF for 15 min and their behaviour recorded.

The **statistical analysis** included one between-subjects factor: GROUP (control-home, IMO-home, IMO-OF). When repeated measures were included in the analysis, the within-subjects factors were SAMPLING TIME (3 levels) for endocrine data or BLOCK (3 levels) for motor activity data.

RESULTS

The analysis of baseline **ACTIVITY** (pre-IMO time 0–5) revealed no statistically significant differences among groups, whereas statistical analysis of post-IMO activity revealed a significant effect of group (Wald χ^2 (1) = 29.84, $p < 0.001$) and block (Wald χ^2 (2) = 76.54, $p < 0.001$), with no interaction (Figure 4). These data reflect that exposure to IMO caused a marked inhibition of activity in the OF and that activity was progressively reduced over time in both control and IMO groups due to habituation to the OF.

The analysis of activity of animals in the OF on day 8 (retention, FIGURE 5) revealed no significant effect of group, but a significant effect of block (Wald χ^2 (2) = 120.78, $p < 0.001$), reflecting a progressive decline in activity over the 15 min session.



FIGURE 5. DISTANCE TRAVELLED IN AN OPEN FIELD (OF) FOR EXPERIMENT 2 ON DAY 1 (PRE-IMO AND POST-IMO PERIOD) AND DAY 8 (RETENTION). Means and SEM are represented. The groups were: control-OF, which were exposed to the OF for 5 min, left undisturbed in their home-cages in the animal room for 25 min and then returned to the OF for an additional 90 min period (R 0–90); IMO-home, which were allowed to explore the OF for 5 min, then exposed to IMO inside the OF for 25 min and finally returned to their home-cages in the animal room; and IMO-OF groups, which were treated as the previous group but were released from the IMO board and maintained in the same OF for an additional post-IMO period of 90 min. On day 8, activity was evaluated in three time blocks of 5 min each.

*** $p < 0.001$ vs. control-OF group, regardless of time.

Analysis of **PLASMA ACTH** levels (**FIGURE 6**) revealed significant effects of group (Wald χ^2 (2) = 166.78, $p < 0.001$), sampling time (Wald χ^2 (2) = 414.74, $p < 0.001$) and the interaction group \times sampling time (Wald χ^2 (4) = 421.27, $p < 0.001$). Further analysis showed very high levels of ACTH immediately after IMO in the two stressed groups as compared to the control OF group; during the post-IMO period, the only significant differences among the groups was the higher levels of ACTH of IMO-OF as compared to control-OF group at 45 min post-IMO.

Statistical analysis of **CORTICOSTERONE** levels (**FIGURE 6**) indicated significant effects of group (Wald χ^2 (2) = 29.88, $p < 0.001$), sampling time (Wald χ^2 (2) = 22.74, $p < 0.001$) and the interaction group \times sampling time (Wald χ^2 (4) = 65.07, $p < 0.001$). Further analysis revealed the same pattern as ACTH: very high lev-

els of corticosterone immediately after IMO in the two stressed groups as compared to the control-OF group and higher levels of corticosterone in IMO-OF as compared to control-OF group ($p < 0.01$) at 45 min post-IMO. The analysis of HPA response to the OF on day 8 revealed no effect of group for ACTH or corticosterone levels (FIGURE 6).

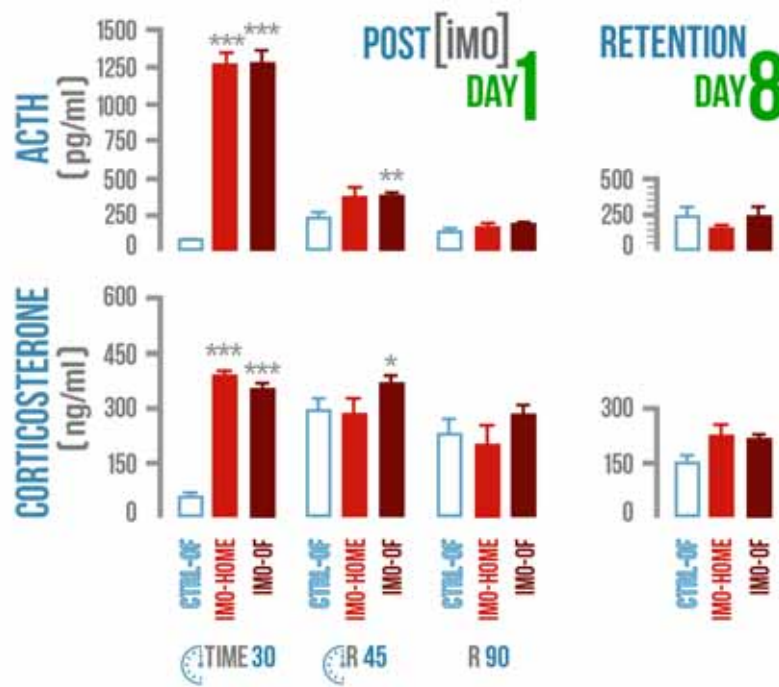


FIGURE 6. PLASMA ACTH AND CORTICOSTERONE LEVELS FOR EXPERIMENT 2. Means and SEM are represented. The groups were: control-OF, which were exposed to the OF for 5 min, left undisturbed in their home-cages in the animal room for 25 min and then returned to the OF for an additional 90 min period (R 0–90); IMO-home, which were allowed to explore the OF for 5 min, then exposed to IMO inside the OF for 25 min and finally returned to their home-cages in the animal room; and IMO-OF groups, which were treated as the previous group but were released from the IMO board and maintained in the same OF for an additional post-IMO period of 90 min. Hormone levels on day 1 (just after IMO (time 30) and at 45 and 90 min after IMO (R45 and R90) and on day 8 (retention) are represented.

, **, *: $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ vs. control-OF group.*

Exposure to IMO in a particular environment resulted in a marked activation of the HPA axis.

However, contrary to the results obtained after FS in the previous experiment, no obvious endocrine evidence for conditioning was observed in the immediate post-IMO period, considering that IMO-home and IMO-OF groups did not differ in plasma levels of ACTH and corticosterone at any time. IMO-OF rats showed marked hypo-activity in the OF during all the post-IMO period as compared to controls, but this can reflect the unconditioned inhibition of activity caused by exposure to severe stressors (i.e., Reinstein et al., 1984; Pol et al., 1992).

More importantly, when animals were exposed again, on day 8, to the OF, no evidence for conditioning was found. Thus, ***similar levels of activity were observed in all groups, with no evidence for freezing in IMO rats.*** Moreover, ***plasma levels of ACTH and corticosterone were similar in all groups, thus supporting the lack of conditioning.***

EXPERIMENT 3

The objective of the experiment was to directly **study whether the differences in the acquisition of fear conditioning between FS and IMO were related to the different characteristics of the context and/or to a much stronger association to the IMO board, acting as a cue, than to the context in the IMO group.** To this end, animals were assigned to three experimental groups (**FIGURE 7**): control, FS and IMO. All animals were individually exposed to the large shock chambers.

We modified the present protocol respect to the preceding ones for three reasons. First, **we reduced the time of stress exposure** considering that 15 min of acquisition of fear conditioning is enough to develop a very strong fear conditioning as well as to get an appropriate activation of the HPA axis. Second, **we did not follow behaviour during the post-stress period on day 1** as no relevant additional information was obtained in the preceding experiments. Finally, **we exposed the rats to a 15 min testing session** to analyze both behavioural and hormonal data.

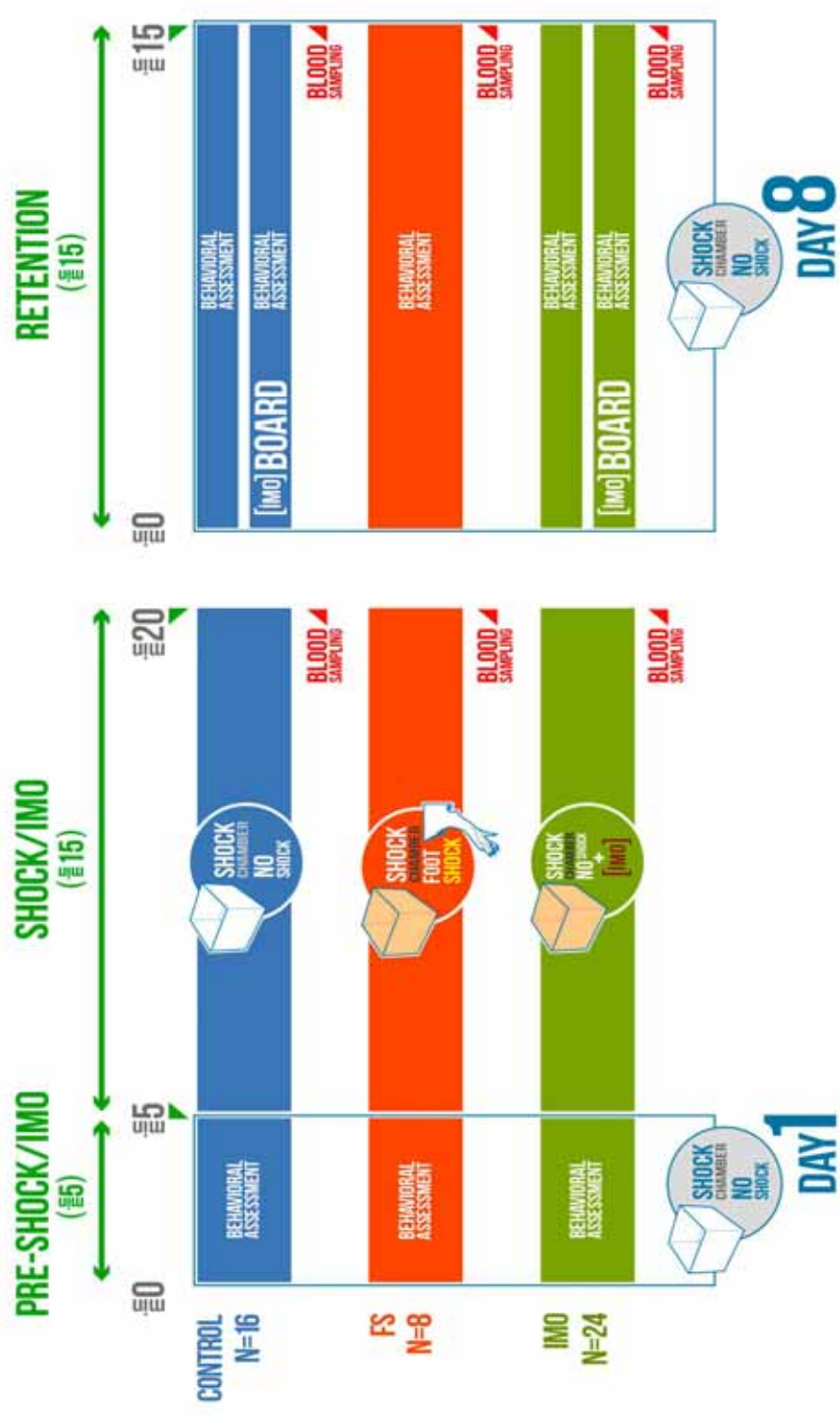


FIGURE 7. AN OUTLINE OF EXPERIMENT 3 (see the text for details)

DESIGN

On day 1, all animals were exposed for 5 min to large chambers without receiving FS (pre-shock/IMO time 0–5). After that, the treatment differed in function of the experimental group (Figure 1C): rats from the **control group** (n = 16) were maintained for an additional 15 min period in the chamber without receiving shock. The rats from the **FS group** (n = 8) were exposed for 15 min (shock time 5–20) to 15 shocks in total. The rats from the **IMO group** (n = 24) were immobilized and maintained for 15 min (IMO time 5–20) within the chambers (without FS). After these procedures, all rats were blood sampled and returned to their regular home-cages.

On day 8 (retention), all rats were exposed to the chamber for 15 min to evaluate freezing and motor activity as measures of contextual fear conditioning. In order to know whether the IMO board acted as a cue for the IMO procedure, half of the rats from the control and IMO groups were introduced inside an empty chamber, whereas the other half were exposed to the chamber with the IMO board inside. The IMO board was located in one of the sides of the chamber. A blood sample was taken after the end of the test. Behaviour was recorded in the chambers for all groups, in 5 min blocks. The chamber was divided into 3 equal zones (z1, z2, and z3), being z1 the zone where the board was placed and z3 the opposite zone. The time spent in each zone was also evaluated.

The **statistical analysis** included one between-subjects factor: either STRESS on day 1 (control, FS, and IMO) or GROUP on day 8 (control, FS, IMO, IMO-board). On day 8, both control groups (with or without the board) were treated as a whole because no significant differences between them were detected. When repeated measures were included in the analysis, the within-subjects factor were BLOCK (3 levels) for the motor activity and freezing data or ZONE (3 levels) for time spent in the different sections of the FS chamber.

RESULTS

The analysis of baseline activity in the chamber on day 1 revealed no statistically significant differences among groups (data not shown). When animals were exposed again 7 days later to the chamber, without FS or IMO, (**FIGURE 8**), the analysis showed significant effects of group (Wald χ^2 (3) = 54.21, $p < 0.001$), block (Wald χ^2 (2) = 28.59, $p < 0.001$) and the interaction group \times block (Wald χ^2 (6) = 17.34, $p < 0.001$). The decomposition of interaction indicated that only the FS group showed a significant hypo-activity in the chamber over the three blocks of time in comparison to control animals.

IMO groups presented an increase in activity if compared with controls. These data can be explained because the control group had more time to explore the chamber on day 1 (20 min) than the IMO group (5 min). The analysis of freezing behaviour during re-exposure (retention) on day 8 to the conditioned context followed the same pattern as activity (**FIGURE 8**).

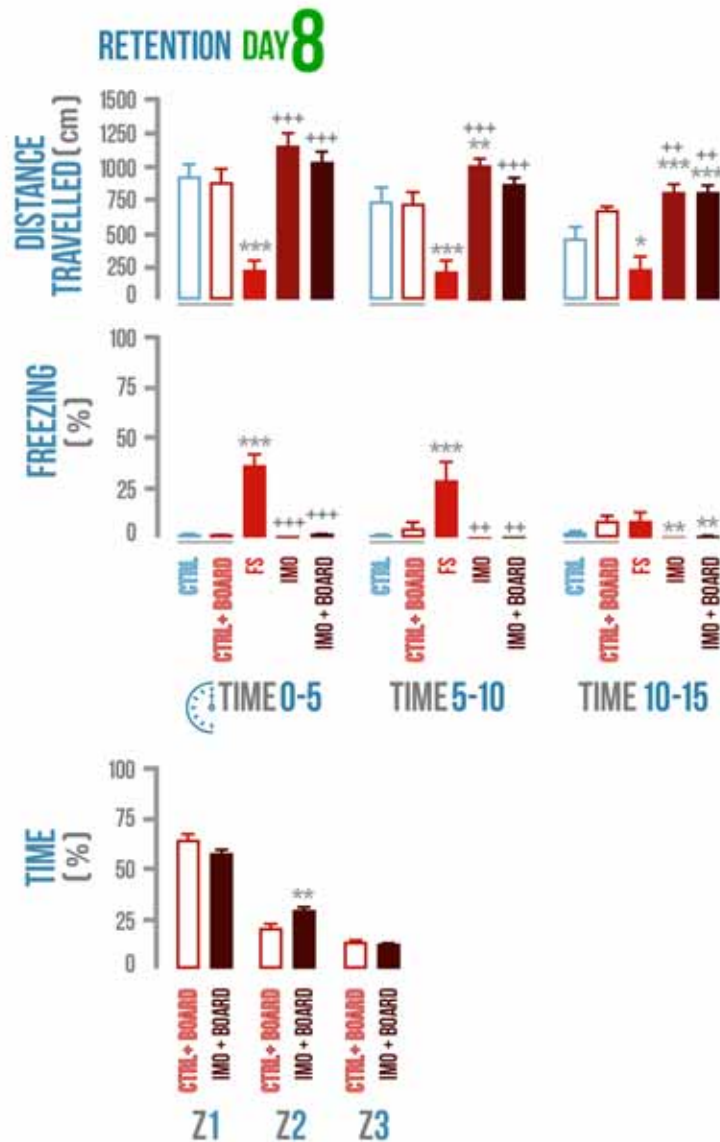


FIGURE 8. BEHAVIORAL DATA FOR EXPERIMENT 3 ON DAY 8 (RETENTION). Means and SEM are represented. The groups were: control, rats exposed for 20 min to the chamber without shocks; FS, rats allowed to explore the chamber for 5 min and then exposed to shocks for 15 min; and IMO, rats allowed to explore the chamber for 5 min and then exposed to IMO inside the chamber for 15 min. On day 8 control and IMO rats were tested without the presence of the board or with the board (control-board and IMO-board groups). Control and control+board groups are presented separately in the graphs but they were pooled for the statistical analysis. Distance traveled during the 15 min exposure to the chamber (5 min blocks), freezing during the 15 min exposure to the chamber (5 min blocks) and time spent in the area where the board was located (z1), in the intermediate area (z2) or in the opposite area (z3) are represented.

** , ** , ***: $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ vs. control group; + , ++ , +++: $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ vs. FS group.*

The factors group (Wald χ^2 (3) = 42.31, $p < 0.001$) and block (Wald χ^2 (2) = 12.00, $p < 0.001$) were statistically significant, as well as the interaction group \times block (Wald χ^2 (6) = 28.17, $p < 0.001$). Only the FS group showed increased freezing behaviour, reflecting fear conditioning in comparison with control and IMO groups during the first and the second block of time.

At day 8, the time spent in the zone of the chamber where the IMO board was placed was also analyzed. As can be seen in **FIGURE 8**, comparison of the two groups of animals exposed to the chamber with the IMO board present as a cue, revealed that the stress factor was not statistically significant. However, zone (Wald χ^2 (2) = 539.41, $p < 0.001$) and the interaction stress \times zone (Wald χ^2 (2) = 15.47, $p < 0.01$) were statistically significant. The data indicated that there were no differences between control and IMO animals in the time spent in the zone with the IMO board (z1), whereas the IMO group showed slightly higher time in the intermediate zone (z2) than controls.

The analysis of plasma ACTH on day 1 (**FIGURE 9**) showed a significant effect of stress (Wald χ^2 (2) = 238.13, $p < 0.001$). Both FS and IMO groups showed higher levels of ACTH as compared to control groups ($p < 0.001$), and FS also differed from the IMO group ($p < 0.05$). When animals were re-exposed at day 8 to the chamber (Figure 7C), group differences were again statistically significant (Wald χ^2 (3) = 57.06, $p < 0.001$), but in this case the FS group showed higher levels of ACTH as compared to control ($p < 0.001$) and IMO groups ($p < 0.001$), reflecting hormonal fear conditioning.

Plasma corticosterone levels on day 1 (**FIGURE 9**) followed the same pattern as ACTH: group effect was statistically significant (Wald χ^2 (3) = 38.67, $p < 0.001$), and both stressed groups showed higher levels of corticosterone immediately after stress ($p < 0.001$).

The analysis of corticosterone levels after re-exposure to the conditioned context (chamber) at day 8 (**FIGURE 9**) revealed a significant effect of group (Wald χ^2 (3) = 28.02, $p < 0.001$): FS group showed the highest levels of corticosterone, differing from controls ($p < 0.001$), IMO ($p < 0.01$) and IMO + board groups ($p < 0.01$). IMO and IMO + board groups showed higher levels of corticosterone than controls ($p < 0.01$, $p < 0.05$ respectively).

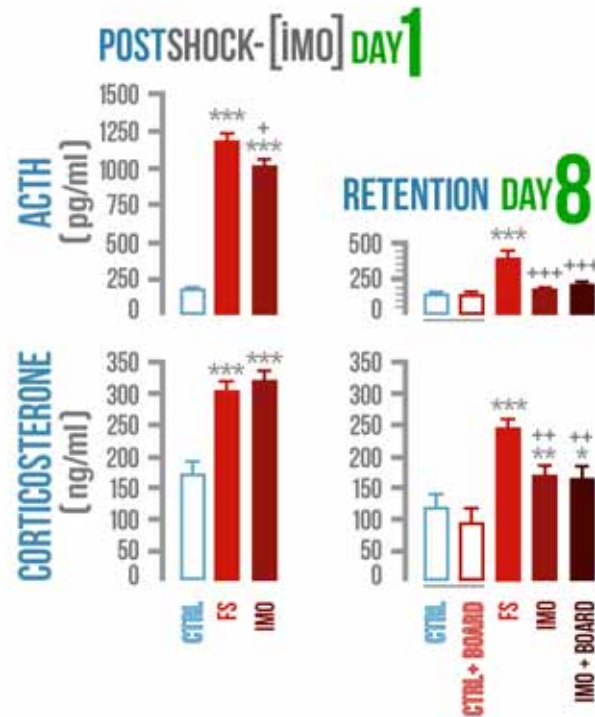


FIGURE 9. PLASMA ACTH AND CORTICOSTERONE LEVELS FOR EXPERIMENT 3. Means and SEM are represented. The groups were: control, rats exposed for 20 min to the chamber without shocks; FS, rats allowed to explore the chamber for 5 min and then exposed to shocks for 15 min; and IMO, rats allowed to explore the chamber for 5 min and then exposed to IMO inside the chamber for 15 min. On day 8 control and IMO rats were tested without the presence of the board or with the board (control-board and IMO-board groups). Control and control + board groups are presented separately in the graphs but they were pooled for the statistical analysis. The post-stress hormone levels on day 1 and day 8 (retention) are shown.

, **, *: $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ vs. control group; +, ++, +++: $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ vs. FS group.*

As expected, FS and IMO groups showed much higher levels of ACTH and corticosterone than controls immediately after stressors, with FS rats showing slightly higher levels than IMO rats. However, when tested for fear conditioning marked differences emerged between the two groups. Previously shocked rats showed high levels of freezing that progressively decreased over the 15 min period, whereas IMO rats showed very low levels of freezing similar to controls. Similarly, shocked rats showed hypoactivity, whereas IMO rats did

not. Importantly, *the presence of the IMO board did not modify the behaviour of either control or IMO rats, demonstrating that it did not act as a particular cue for fear conditioning*. In fact, in the presence of the board, both control and IMO rats spent more time in the area where the board was located than in the opposite area, with no evidence of avoidance in the IMO rats. Supporting behavioural results, FS rats showed higher ACTH and corticosterone responses to the large FS chamber than control and IMO rats. Despite no differences between IMO and controls rats in the ACTH response to the FS chamber, slightly higher levels of corticosterone were observed in IMO and IMO + board rats as compared to controls ($p < 0.01$, $p < 0.05$, respectively).

DISCUSSION

In the present work we demonstrated that *exposure to a single session of FS induced a strong contextual fear conditioning as deduced from the behavioural and endocrine responses, whereas, we were unable to find similar evidence for contextual conditioning after exposure to IMO in a particular environment*. The striking contrast between the two stressors regarding contextual fear conditioning was further demonstrated in a last experiment comparing directly the consequences of exposure to the two stressors in the same context. In addition, the last experiment demonstrated that the IMO board did not act as a putative cue. Therefore, **fear conditioning appears to develop easier after exposure to certain aversive stimuli than others**. Exposure of animals to single or repeated FS in a specific environment easily results in the development of contextual fear conditioning, but the extent to which exposure to any kind of stressor always results in contextual fear conditioning is unclear.

We found in our lab preliminary negative behavioural evidence about the development of contextual fear conditioning to IMO. Therefore, we first decided to demonstrate that, in our conditions, contextual fear conditioning to FS easily develops that should be reflected not only in the standard measure of freezing, but also in the activation of the HPA axis. High levels of freezing were found in the FS chamber group when the rats were returned to the FS chamber immediately after blood sampling and when assessed again at 30 min post-shocks. These data clearly demonstrated that strong contextual fear

conditioning developed in FS rats, which was maintained at a high level even 30 min after the termination of FS.

Measurement of plasma levels of ACTH and corticosterone demonstrated that mere exposure to the FS chambers without shocks caused a modest activation of the HPA axis. This is not surprising as the FS chamber constitutes a novel environment for the animals and this consistently elicits activation of the HPA axis (i.e., Márquez et al., 2005). As expected, both FS groups showed a much higher activation of the HPA axis than controls, however, the FS-chamber group showed clearly higher levels of ACTH than the FS-home group. These differences in ACTH between the two FS groups at 30 min post-shock cannot be explained by the slightly higher levels observed in control-chamber as compared to control-home groups.

Therefore, it appears that the HPA axis is able to reflect the enhanced fear caused by maintenance of the animals in the environment previously associated to the aversive experience of FS.

To our knowledge, the influence of maintaining the rats in the shock environment on the HPA axis has only been previously studied in one single study, with similar results (Gao et al., 2008). It is therefore clear that these results are also in accordance with previous data demonstrating that HPA hormones are quite sensitive to the degree of stress experienced by animals (Armario, 2006) and, more particularly, to fear conditioning (Van de Kar et al., 1991; Campeau et al., 1997; Merino et al., 2000; Muñoz-Abellán et al., 2009; Daviu et al., 2010).

When rats were again exposed 7 days later to the FS context, both FS groups showed the expected high levels of freezing as compared to non-shocked groups. In fact, their levels of freezing were similar as those reported in the FS-chamber group at 30 min post-shock on day 1, indicating that freezing was basically maintained intact over the days, with no evidence for extinction in those rats which were maintained for 30 min in the chamber without additional shocks on day 1. Once characterized the response to FS we did an analogous design with IMO as the stressor. The results showed that exposure to IMO in a particular environment (OF) was apparently unable to induce contextual fear conditioning, despite the huge activation of the HPA axis elicited by the stressor and its slower post-stress recovery of resting levels. This is a particular characteristic of IMO that is related to their high intensity (Martí et al., 2001; Márquez et al., 2002). In spite of this, no obvious endocrine evi-

dence for conditioning was observed in the immediate post-IMO period in that plasma levels of HPA hormones did not differ in IMO-home and IMO-OF groups during this phase.

Can behaviour of rats in the OF during the post-IMO period give us some clues about conditioning? IMO-OF rats showed marked hypo-activity in the OF during all the post-IMO period as compared to controls. However, such a hypo-activity cannot be considered as a reflection of conditioning as exposure to severe stressors, including IMO, resulted in unconditioned inhibition of activity for some hours after the stressor (i.e., Reinstein et al., 1984; Pol et al., 1992). As freezing was not observed, the results tentatively suggest that exposure to IMO in the OF did not result in the development of contextual fear conditioning. This assumption was supported by the lack of changes in activity and the absence of freezing when IMO animals were exposed again, on day 8, to the OF for 15 min. Importantly, ACTH and corticosterone response during the 15 min re-exposure to the OF were similar in control and IMO rats. As such a period of exposure to the context appears to be optimum for HPA hormones to reflect contextual fear conditioning to FS or cat odour (Muñoz-Abellán et al., 2009; Daviu et al., 2010), the hormonal data add support to the lack of IMO-induced contextual fear conditioning.

The above results may suggest that rats were unable to acquire contextual fear conditioning to IMO. However, it could be argued that in the previous experiments the context was very different with FS and IMO and that the most relevant stimulus for IMO was the presence of the board. To rule out the above explanations, a final experiment was done using the same context (a large chamber) for both FS and IMO. Seven days after the stressors, control, FS, and IMO animals were tested for fear conditioning in the grid box either in the absence or the presence of the IMO board. Both behavioural (freezing and hypo-activity) and hormonal (HPA hormones) data supports that only the previous shocked rats showed strong evidence for contextual fear conditioning. Furthermore, the introduction of the board failed to induce cue-fear conditioning in the IMO-board group.

Taken together, the results strongly support the hypothesis that IMO rats were unable to associate stress exposure to either cue or context. It is intriguing that IMO rats tested in the large chamber showed modest but consistent hyperactivity together with a slight increase in the corticosterone (but not ACTH) response to the chamber.

Although we do not know the reason for these effects, we can speculate that a high level of arousal, not just fear or anxiety, may explain both enhanced activity and the slightly higher corticosterone response (the discrepancy with ACTH may be explained by a very transient ACTH response not observable at 15 min). In fact, immediate prior exposure to low intensity stressors, which probably promotes arousal, has been found to increase activity/exploration in novel environments (i.e., Katz et al., 1981).

On the basis of prior data (Márquez et al., 2002) and the HPA response to FS and IMO, the two stressors appear to be severe and approximately of the same intensity. Therefore, low severity does not appear to be the reason for the lack of contextual fear conditioning to IMO. In the present experiment IMO rats were allowed to explore the environment before IMO and it is unlikely that they could not learn about the context before experiencing IMO. It is also unlikely that IMO would have induced some kind of amnesic effects about the context. We have recently found that contextual fear conditioning to cat odour is basically unaffected in rats that were allowed to explore an OF containing a cloth impregnated with cat odour before being immobilized and returned in these conditions to the same context for an additional 15 min period (Muñoz-Abellán et al., 2011). These results indicate that IMO is unlikely to interfere with cat odour-induced contextual fear conditioning.

The lack of fear conditioning with IMO may be due to several reasons: the type of US, the type of CS, the procedure involved in the CS-US pairing and the type of measure used to evaluate the CR. As we relied on several different CRs (activity/immobility, avoidance, freezing, and HPA activation), it is unlikely that this was the reason for the differences between FS and IMO. Moreover, by changing the way of transporting the animals or the experimenter and by introducing specific odours in the stress chamber, we have been unable to demonstrate fear conditioning to IMO (unpublished), supporting the incapability of the animals to associate IMO to different types of CS.

Another difference between FS and IMO is that the former is a discrete stimulus (with a clear on and off signal), whereas IMO is a continuous stimulus. Therefore, FS rats had more opportunities to associate the context with the aversive stimulus. However, this does not appear to be the main reason for the discrepancies.

First, it is well-established in the literature that one single shock is able to induce context fear conditioning (i.e., Radulovic et al., 1998). In fact, we have

obtained in rats of the same strain and age as those used in the present experiments strong context fear conditioning with one single-shock (Daviu et al., 2010). Considering that IMO is a severe stressor, association may be observed after a single IMO session, which is not the case.

Second, no evidence for contextual fear conditioning was observed when animals were immobilized and released from the board several times in a unique session, maintaining the animals in the context in between (unpublished). Although the latter procedure approached to that of FS, it failed again to find fear conditioning. As we cannot rule out that fear conditioning to IMO could be established by particular, not yet characterized, CS, the most parsimonious explanation for the present results is that the nature of the US (IMO) somehow makes more difficult the association with a particular CS.

This idea fits well with the concept of “preparedness” applied to aversive (fear) conditioning initially proposed by Seligman (1971) and refers to the fact that some CS-US associations are easier to develop because are somehow biologically prepared. That is, animals are not biologically well-prepared to develop contextual fear conditioning to any kind of stressor, but only to a subset of them. The first evidence about biological predisposition to establish CS-US associations was obtained in rats by García and Koelling (1966) demonstrating that gastrointestinal malaise caused by the administration of lithium chloride was associated to the ingestion of a novel taste food (saccharin) but not to an exteroceptive CS such as noise, whereas FS exposure was associated to noise but not to the novel taste.

Interestingly, it has been very difficult to observe contextual conditioning using a component of fox odour, trimethylthiazoline (TMT), as US (i.e., Blanchard et al., 2003), despite the fact that TMT is an aversive substance that induce by itself defensive behaviours and activates the HPA axis (Morrow et al., 2000). Within this framework, it appears that the critical role of glucocorticoids to strengthening CS-US associations would be dependent on the pre-existence of neuronal circuits allowing the convergence of information concerning CS and US in the basolateral complex of the amygdala.

The present results not only demonstrate that ***induction of contextual fear conditioning using standard procedures may be dependent on the type of stressor, but they also have implications regarding the evaluation of putative animal models of PTSD***. Exposure to certain stressors, including predator odour and FS, has been reported to induce long-lasting (days to weeks)

changes in activity in novel environment and/or anxiety-like behaviour as measured in the elevated plus-maze (see Introduction) and this has been considered to be important for their characterization as putative animal models of PTSD.

In contrast, IMO is a severe stressor from a physiological point of view, but no changes in anxiety-like behaviour as evaluated in the EPM or activity in novel environments is usually observed after the first week post-IMO (Belda et al., 2004, 2008). Similarly, reduced social interaction caused by a tail-shock procedure used in the standard learned helplessness paradigm dissipated on 3 days (Maier, 1984) and the effects of the procedure on the EPM are not consistent even during the first 24 h (Grahn et al., 1995). However, IMO can induce long-lasting endocrine and behavioural sensitization (in terms of anxiety) to further stressors (Belda et al., 2008) as well as long-lasting impairment of spatial memory in the Morris water maze (Andero et al., 2012) and fear extinction (Andero et al., 2011), changes both that mimics those reported in PTSD patients (McNally, 1998; Yehuda and LeDoux, 2007; Moore, 2009).

We have suggested that, at least, some of the long-lasting changes in activity or anxiety-like behaviour observed after a single exposure to some stressors may be related to their proneness to induce contextual fear conditioning rather than with their traumatic nature (Armario et al., 2008). In fact, we have recently demonstrated that hypo-activity in novel environment is observed even 12 days after a single exposure to FS and this effect disappeared with a procedure that impeded the induction of contextual fear conditioning (Daviu et al., 2010).

Although some authors have reported enhanced startle response for 7–10 days after one or three sessions of tail-shock (i.e., Servatius et al., 1995; Manion et al., 2007), the effects were not observed during the first 3 days, suggesting some incubation process, probably involved non-associative memory.

Persistence of non-associative effects of severe stressors is likely to differ between individuals (species, strains, environmental conditions). It would be important to directly demonstrate the direct relationship between the establishment of contextual fear memory and the persistence of long-lasting changes in anxiety-like behaviour. If such a relationship holds true, it could question some putative animal models of PTSD.

In conclusion, the present results indicate that acquisition of contextual fear conditioning is extremely easy with FS as aversive stimulus, whereas appears to be extremely difficult to be acquired using a stressor such as IMO, which is of a similar severity as high intensity FS. A good correlation was observed between behavioural signs of fear conditioning and the activation of the HPA axis, thus confirming previous reports demonstrating that plasma levels of ACTH and corticosterone are able to specifically reflect fear conditioning (see Armario et al., 2012 for further discussion). If some of the long-lasting behavioural effects of stress when tested in novel environments are dependent on the acquisition of contextual fear conditioning, the difficulties of animals to acquire IMO fear conditioning can explain the failure to find some long-lasting effects when free behaviour in novel environments is tested. The present data introduce some caveats regarding development of animal models of PTSD.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2008-01175 and SAF2011-28313), Instituto de Salud Carlos III (RD06/0001/0015, Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud, Ministerio de Sanidad y Consumo), Plan Nacional sobre Drogas and Generalitat de Catalunya (SGR2009-16). Núria Daviu was a recipient of a MEC Fellowship.

