



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Aprendizaje y regulación emocional de la conducta:
Bases neurales y comportamentales de cambios sorpresivos en la recompensa**

Tesis presentada para optar por el título de
Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Rocío Candela Fernández

Director: Dr. Rubén Muzio

Director Adjunto: Dr. Martín Puddington

Consejero de Estudios: Dr. Walter Farina

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Biología del Comportamiento, Instituto de Biología y
Medicina Experimental (IBYME)

Fecha de defensa: 20/12/2024

2024

Los resultados de esta Tesis de Doctorado han sido publicados parcialmente hasta el momento en los siguientes artículos:

Fernández, R. C., Puddington, M. M., Kliger, R., Core, J. D., Jure, I., Labombarda, F., Papini M. R., & Muzio, R. N. (2024). Instrumental successive negative contrast in rats: Trial distribution, reward magnitude, and prefrontal cortex activation. *Physiology and Behavior*, 278, 114511. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2024.114511>

Fernández, R. C., Puddington, M. M., & Muzio, R. N. (2024). Avances en la investigación sobre las bases neurales del Contraste Negativo Sucesivo. *Revista Interdisciplinaria*. In Press.

Tabla de contenido

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Agradecimientos.....	3
Capítulo 1: Introducción y consideraciones generales.....	4
Capítulo 2: Efecto de la pendiente del corredor recto en el fenómeno de CNSi.....	30
Capítulo 3: Efectos de la distribución de los ensayos y de la discrepancia entre montos de refuerzo en el CNSi.....	43
Capítulo 4: Registros de la actividad de la corteza prefrontal medial durante el Contraste Negativo Sucesivo instrumental.....	79
Capítulo 5: Conclusiones generales y direcciones futuras.....	119
Bibliografía.....	125

Resumen

El Contraste Negativo Sucesivo (CNS) es un fenómeno que se expresa como un deterioro de la respuesta comportamental, en sujetos que han sido expuestos a una devaluación significativa de una recompensa apetitiva. Ha sido utilizado durante décadas para estudiar la relatividad de la recompensa, el efecto de la pérdida sorpresiva de un incentivo esperado y la respuesta de frustración. En paradigmas similares, esta devaluación lleva a la aparición de comportamientos relacionados al estrés y la ansiedad. Particularmente, el CNS instrumental (CNSi) implica un deterioro transitorio del comportamiento anticipatorio en tareas en las que los sujetos deben realizar una respuesta para obtener un refuerzo. En esta Tesis, utilizando un modelo experimental en ratas, se evaluaron distintos parámetros que modulan este fenómeno (expectativa, discrepancia entre lo obtenido y lo esperado, y esfuerzo de respuesta) para obtener una expresión robusta del efecto de CNSi, que posteriormente fue utilizado para estudiar sus bases neurales. Para ello, se utilizaron dos técnicas: (i) Inmunohistoquímica de c-Fos de la corteza prefrontal medial (CPFm) en ratas que recibieron una devaluación de alimento sólido. Se observó un aumento en la actividad de la corteza cingulada anterior en sujetos devaluados, en comparación con sujetos no devaluados. (ii) Registros electrofisiológicos en la CPFm durante un protocolo de CNS en ratas con cabeza fija que recibieron una devaluación de soluciones azucaradas. Se observó un aumento en la tasa de disparo de las neuronas piramidales tras la devaluación y cambios en su patrón de respuesta. Globalmente, los resultados indicaron que el fenómeno de CNSi requiere de un número mínimo de ensayos pre-cambio, así como también que la discrepancia entre lo esperado y lo obtenido debe superar un cierto umbral. Por último, la CPFm parece cumplir un papel importante en este paradigma.

Palabras clave: Devaluación de una recompensa, Relatividad de la recompensa, Frustración, Corteza prefrontal medial

Abstract

Learning and emotional regulation of behavior: Neural and behavioral bases of surprising changes in reward

Successive Negative Contrast (SNC) is a phenomenon expressed as a deterioration in behavioral response in subjects exposed to a significant devaluation of an appetitive reward. For decades, this phenomenon has been used to study reward relativity, the effect of unexpected loss, and the response to frustration. In similar paradigms, this devaluation leads to the emergence of behaviors related to stress and anxiety. Specifically, instrumental SNC (iSNC) involves a transient deterioration of anticipatory behavior in tasks where subjects must make a response to obtain reinforcement. This Thesis evaluated various parameters in rats that modulate this phenomenon (expectation, discrepancy between received and expected outcomes, and response effort) to produce an iSNC effect, which was subsequently used to study its neural bases. Two techniques were used for this purpose: (i) c-Fos immunohistochemistry of the medial prefrontal cortex (mPFC) in rats that received a devaluation of solid food. An increase in anterior cingulate cortex activity was observed in devalued subjects compared to non-devalued ones. (ii) Electrophysiological recordings in the mPFC during an iSNC protocol in head-fixed rats that received a devaluation of sucrose solutions. As a result, an increase in the firing rate of pyramidal neurons and changes in their response patterns were observed following devaluation. The results globally indicated that the iSNC phenomenon requires a minimum number of pre-shift trials, and that the discrepancy between expected and obtained rewards must exceed a certain threshold. Finally, the mPFC appears to play a significant role in this paradigm.

Keywords: Reward devaluation, Reward relativity, Frustration response, Medial prefrontal cortex.

Agradecimientos

A las Instituciones:

- . Universidad de Buenos Aires por la excelencia en la formación.
- . Agencia y CONICET por las becas que hicieron posible este doctorado.
- . IBYME por los compañeros, la comunidad y el lugar de trabajo.

A las personas:

- . A mis directores, Rubén y Martín, por su enseñanza y su apoyo.
- . Al Grupo de Circuitos Neuronales, Cognición y Conducta por permitirme colaborar. Particularmente a Eze y a Cami.
- . A mis compañeros, que hicieron los días más alegres y enriquecedores en el laboratorio.
- . A Inés y Flor, que desde cerca o desde lejos, fueron grandes amigas y partícipes en cada paso de este camino.
- . A Silvia y Claudio, que me abrieron las puertas de su hogar con cariño, y me brindaron su sol durante la pandemia, en las largas mañanas y tardes de estudio.
- . A mis amigas Luli y Evelyn, que me apoyaron siempre en todo.
- . A mi familia, por su acompañamiento y su amor incondicional.
- . A mis sobrinos, que muchas veces me recordaron lo hermoso de hacerse preguntas y de maravillarse con lo cotidiano.
- . A mi amor, Pato, que llegó a mi vida cuando la idea del doctorado se concretó y estuvo conmigo en cada momento, en las buenas y en las no tan buenas.
- . A mi mamá, cuyos ojos siempre me vieron con orgullo y me permitieron creer que podía con esto.
- . A mi papá y mi tío Alfredo, dos personas que se fueron demasiado temprano de este mundo, pero cuyos valores y enseñanzas son los pilares de mi vida.

Capítulo 1

Introducción y Consideraciones Generales

1.1 Consideraciones teóricas generales del aprendizaje y la evolución del comportamiento

El **aprendizaje** es el proceso de adquisición de nueva información (externa y/o interna) que produce un cambio en el comportamiento animal. Por lo tanto, es uno de los procesos biológicos más importantes que facilitan la adaptación de los individuos al ambiente. Según Domjan (2007), las especies vuelven incluso más eficientes las funciones biológicas necesarias para la supervivencia a partir del aprendizaje (e.g., el caso de la reproducción o la búsqueda de fuentes de alimento).

Dentro de esta definición de aprendizaje, podemos encontrar al aprendizaje asociativo. Existe un consenso que indica que el aprendizaje asociativo implica “adquisición, almacenamiento y recuperación de información acerca de eventos que ocurrieron con cierta contigüidad temporal o espacial” (Papini, 2002). Este fenómeno suele estudiarse utilizando, por ejemplo, procedimientos de condicionamiento operante, que se centra en la asociación entre un comportamiento y sus consecuencias. En todas las situaciones de condicionamiento operante, un comportamiento ejecutado por el sujeto es seguido por la ocurrencia de un evento particular en el ambiente. En general, se considera entonces que ese comportamiento está de alguna manera reforzado. Se denomina *refuerzo o reforzador* a cualquier evento que modifica la probabilidad de la ocurrencia de un determinado comportamiento, siempre que ocurra de manera contingente. De esta forma, se pueden dividir las consecuencias de la respuesta comportamental, entre recompensas (refuerzos que aumentan la probabilidad de suceso de una acción) o castigos (refuerzos que disminuyen la probabilidad del comportamiento) (Kazdin, 2012).

A su vez, el valor de un estímulo es una dimensión continua que va desde lo apetitivo (agradable - positivo) hasta lo aversivo (desagradable - negativo), pasando por un valor neutro. Este carácter dimensional, adicionalmente, implica que dos estímulos, aun siendo ambos agradables, pueden variar en su valor. Por lo tanto, la fuerza de asociación entre la respuesta y su consecuencia estará afectada por esta propiedad. Experimentalmente, la noción de valor del estímulo puede observarse evaluando la robustez de la respuesta de acuerdo a parámetros como frecuencia o intensidad de la conducta. Ciertos refuerzos producirán un nivel de respuesta mayor a otros. Asimismo, el valor de un incentivo puede verse reflejado en la conducta de elección, es decir, la preferencia entre estímulos apetitivos (Williams, 1994).

Thorndike (1898) fue uno de los pioneros en el estudio experimental de estos procesos de aprendizaje y condicionamiento. Su trabajo se basó en el estudio experimental de la conducta en diversas especies. Para esto utilizó gatos, perros o pollos que colocaba en “cajas problema” de las que tenían que escapar realizando algún tipo de acción (para estos individuos, escapar era un resultado deseable). Los sujetos, además, eran recompensados con alimento luego de resolver la tarea y escapar. De esta manera, según Thorndike, se “imprimían” en el sistema nervioso aquellas conductas que permitían la salida de la caja problema, es decir que resultaban gratificantes. Por este tipo de asociación entre la conducta de escape y el valor positivo de las consecuencias, los animales lograban perfeccionar la resolución de las cajas problema y cada vez demoraban menos tiempo en escapar. Estos resultados parecen demostrar empíricamente cómo muchos de nuestros actos se producen, se mantienen o desaparecen en función de las consecuencias que han tenido en el pasado reciente. En base a estos experimentos, identificó una serie de regularidades, que definió como leyes, y que buscan explicar distintas características de este tipo de aprendizaje. Una de las principales leyes es la denominada “*Ley del Efecto*” que plantea que, entre las diversas respuestas emitidas en un mismo contexto, aquellas que van acompañadas o seguidas inmediatamente por satisfacción para el animal quedarán, al igual del resto de los factores, más firmemente conectadas con esa situación. De este modo, cuando esta se repita, será más probable que también se repitan tales respuestas. De la misma manera, aquellas respuestas que van acompañadas o seguidas inmediatamente por molestias para el animal, se verán debilitadas de tal manera que será menos probable que se repitan. Cuanto mayor sea la satisfacción o la molestia, mayor será el efecto del fortalecimiento o debilitamiento de la conexión entre la respuesta y esa situación.

Este tipo de definiciones contemplan la contingencia de estímulos y respuestas, que favorecen el aumento o disminución de la fuerza asociativa que promueve o disminuye la probabilidad de ejecución de una respuesta particular. Existen otros modelos que, además, proponen que la *sorpresividad* en la aparición de los estímulos puede modular la fuerza asociativa de los eventos. Por ejemplo, el modelo de Rescorla y Wagner (1972) se basa en la idea de que el aprendizaje es impulsado por el error de predicción, es decir, la diferencia entre lo que se espera que suceda y lo que realmente ocurre. Según este modelo, un estímulo sorpresivamente mayor a lo esperado es la base del condicionamiento excitatorio o de los incrementos del valor

asociativo, mientras que un estímulo inesperadamente menor, es la base del condicionamiento inhibitorio o de las disminuciones en el valor asociativo (Domjan, 2007). De esta manera, se contempla la posibilidad de que la modificación de la aparición de los estímulos, no sólo en términos de presencia-ausencia, sino también en magnitud modifique la probabilidad de aparición o de intensidad de una respuesta comportamental.

A su vez, los fenómenos de aprendizaje no son solamente mecánicos, sino que están vinculados a procesos evolutivos de selección, que permiten el desarrollo de habilidades cognitivas que atraviesan especies. Tal es así, que se pueden encontrar patrones de comportamiento similares en grupos filogenéticamente distantes, y por esto, su estudio en el marco evolutivo, aporta cómo las capacidades cognitivas han evolucionado para resolver problemas específicos de supervivencia y reproducción, integrando la teoría psicológica con los principios de la ecología y la evolución (Shettleworth, 2001).

En esta Tesis se utilizarán estas definiciones previas para entender el cambio comportamental que realizan los mamíferos ante una disminución sorpresiva de una recompensa esperada, en situaciones donde la *Ley del Efecto* no se cumple.

1.2 Efectos del cambio sorpresivo del reforzamiento: Fenómenos paradójicos del reforzamiento y Contraste Negativo Sucesivo (CNS)

Si una conducta reforzada positivamente aumenta su probabilidad de emisión, la omisión del refuerzo debería producir el efecto contrario, una disminución de la probabilidad de aparición de una respuesta. Este tipo de procesos en los cuales se elimina un refuerzo se denominan de *extinción*. El cambio conductual que ocurre durante la extinción de una respuesta instrumental es opuesto a lo que se observa durante la adquisición de dicha conducta.

Existen situaciones en las que la extinción no se da de acuerdo a lo esperado en base a la Ley del Efecto y los principios derivados de ella, y que son por lo tanto denominados *Fenómenos Paradójicos del Reforzamiento* (Amsel, 1992). Esta denominación se basa en que dichos fenómenos no pueden explicarse según las teorías clásicas del aprendizaje, que utilizan modelos lineales para entender las variaciones conductuales en la adquisición y la extinción. Por ejemplo, Hull (1943) predice que en la fase posterior al cambio de reforzamiento, los sujetos disminuirían

progresivamente su rendimiento a lo largo de los ensayos. Esto coincide con la Ley del Efecto propuesta por Thorndike, que indica que la respuesta que puede ejecutar un sujeto es directamente proporcional a la magnitud del reforzador recibido (es decir, ante un reforzador de alto valor, la respuesta instrumental será mayor que la respuesta asociada a un reforzador de menor valor). Precisamente, los *fenómenos paradójicos* no se expresan según estas reglas.

Abram Amsel (1922-2006) diseñó experimentos usando un aparato conocido como *double runway* (corredor recto doble) y describió con claridad estos fenómenos paradójicos. Este tipo de aparatos consisten, al igual que el *runway* o corredor recto, en un dispositivo experimental que consta en un pasillo en cuyos extremos se ubican un compartimiento de salida y un compartimiento de llegada. El compartimiento de llegada o caja meta, generalmente contiene un comedero con la recompensa (usualmente alimento sólido). Se mide el tiempo que tarda el animal en recorrer el pasillo. Amsel utilizó este aparato para medir la respuesta de sujetos expuestos a distintos esquemas de reforzamiento: reforzamiento continuo (cuando al final de cada ensayo el sujeto siempre recibía una recompensa) o reforzamiento parcial (cuando la recompensa se entregaba de manera intermitente, incluyendo algunos ensayos no reforzados). Una vez adquirida la respuesta instrumental, los sujetos eran expuestos a un procedimiento de extinción, donde se omitía la presencia del reforzador. Lo que observó fue que las ratas mostraban mayor resistencia a la extinción cuando habían sido entrenadas con reforzamiento parcial, en comparación con las entrenadas bajo refuerzo continuo (fenómeno denominado *Efecto del Reforzamiento Parcial en la extinción*). Este efecto fue explicado por medio de la *Teoría de la Frustración* (Amsel, 1958, 1992). Según esta teoría, la omisión sorpresiva del refuerzo que ocurría en la mitad de los ensayos, al inicio de la fase de adquisición producía una reacción emocional incondicionada llamada *frustración primaria*. Luego se producía, en los siguientes ensayos, un conflicto de acercamiento-alejamiento que enlentecía la respuesta en el *runway* con respecto a los animales de la condición refuerzo continuo. Adicionalmente, se observaban conductas de naturaleza emocional, como la defecación y la micción dentro del corredor recto, o la agresión hacia el entrenador. Este conjunto de conductas se interpretan como una respuesta anticipatoria, denominada *frustración secundaria*. La *frustración secundaria* aparecía como la anticipación a la posible ausencia del reforzador. Finalmente, según la teoría, se produce un efecto de

contracondicionamiento, en el que se condiciona esta *frustración secundaria* con el estímulo apetitivo, lo que provoca una persistencia en la conducta. Los animales que reciben refuerzo parcial y los que reciben refuerzo continuo durante los ensayos de adquisición, se diferencian en que unos han pasado por un proceso de *contracondicionamiento* de la frustración previo y los otros no. Esta diferencia sería la responsable de la extinción más rápida con refuerzo continuo que con refuerzo parcial. Mediante estas mismas ideas, es posible explicar los otros fenómenos paradójicos del reforzamiento, como el *Efecto de la Magnitud del reforzamiento en la extinción* y el *Efecto de Sobreentrenamiento en la extinción*. El *Efecto de la Magnitud del reforzamiento en la extinción*, se refiere al hecho de que la respuesta instrumental disminuye con más rapidez en extinción posterior a la experiencia con un reforzador de mayor valor en comparación con uno de menor valor. Mientras que el *Efecto de Sobreentrenamiento en la extinción* indica que entre más entrenamiento se proporcione con ese incentivo (e.g., un mayor número de ensayos reforzados), más rápida será la extinción de la respuesta (e.g., Ishida & Papini, 1997) (*Figura 1.1*). Este efecto se explica como un efecto derivado de la expectativa. Un mayor número de ensayos reforzados implican una mayor certeza y una expectativa más grande de recibir un refuerzo. Los procesos emocionales descritos en la teoría de la frustración ocurren por la violación de una expectativa, por lo que mientras mayor sea esa expectativa mayor será la frustración.

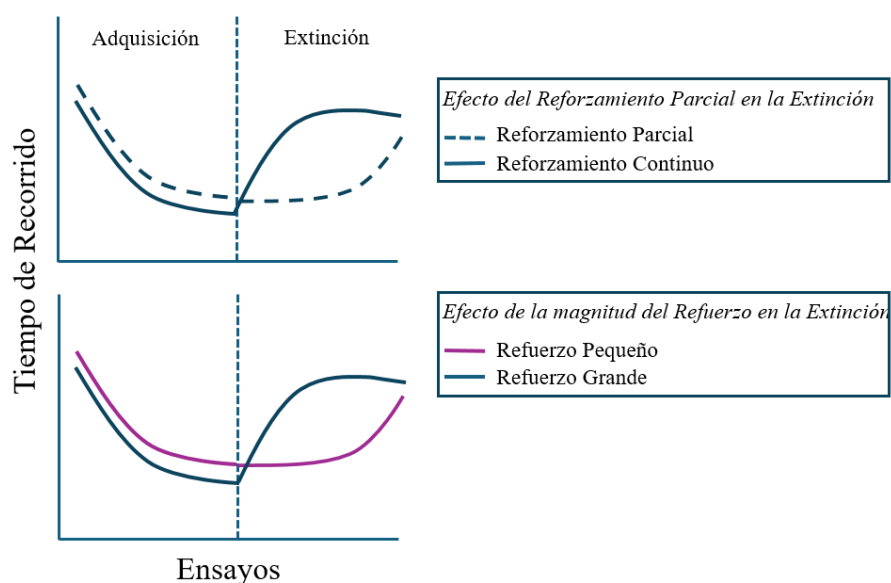


Figura 1.1. Representación idealizada de los fenómenos de Reforzamiento Parcial y de Magnitud del Refuerzo en la extinción.

Otro caso de efecto paradójico del reforzamiento se da cuando se reduce de forma sorpresiva el monto o la calidad de una recompensa. El fenómeno que surge en este tipo de situación se denomina efecto de ***Contraste Negativo Sucesivo (CNS)***. Al igual que Amsel, Crespi (1942) utilizó un corredor recto en el que dos grupos de animales recibieron sesiones de entrenamiento de adquisición con refuerzo continuo. En esta fase del experimento, uno de los grupos recibió un refuerzo grande y el otro un refuerzo pequeño. Aquí observó que la velocidad de los animales era mayor cuanto mayor era la recompensa. A continuación, redujo de manera inesperada la recompensa en el grupo que recibía el monto mayor, de modo que ahora ambos grupos recibían el mismo refuerzo. Observó entonces que la velocidad de los animales que sufrieron la devaluación cayó por debajo de la de los animales que siempre recibieron el refuerzo bajo. Con el transcurso de los ensayos ambos grupos terminaron mostrando el mismo desempeño. Estos resultados también pueden ser explicados por la *Teoría de la Frustración*. La devaluación de un incentivo, al igual que la omisión de la recompensa en el refuerzo parcial, produce una respuesta emocional de *Frustración Primaria*, que posteriormente producirá una respuesta anticipatoria de *Frustración Secundaria*. Así, el efecto de CNS, es decir el deterioro de la respuesta instrumental, se produce como resultado de un conflicto de acercamiento-alejamiento. La *Frustración Secundaria* evoca respuestas de alejamiento que entran en conflicto con el impulso de acercamiento producido por la recompensa (que si bien ha sufrido una devaluación continúa siendo un estímulo apetitivo). Este fenómeno es transitorio, dado que los continuos emparejamientos de la *Frustración Secundaria* y el refuerzo, producen el *Contracondicionamiento* de la frustración (Flaherty, 1996; Papini, 2003). Es importante resaltar que para que el fenómeno de CNS aparezca, el grado de disparidad entre las magnitudes o cualidades de la recompensa antes y después de la devaluación, debe alcanzar un umbral mínimo. Así, aunque un animal puede ser capaz de detectar la diferencia entre dos valores de incentivo, la discrepancia en una situación de reducción de recompensa puede no ser suficiente para producir una respuesta de frustración (Di Lollo & Beez, 1966; González et al., 1962; Papini & Pellegrini, 2006).

Existen distintos procedimientos utilizados para estudiar el efecto de la degradación sorpresiva de la recompensa. Los procedimientos más comunes son conocidos como **Contraste Negativos Sucesivo consumatorio (CNSc)** y **Contraste**

Negativos Sucesivo instrumental (CNSi), y consisten operacionalmente en dos etapas: pre-cambio (etapa de adquisición) y post-cambio (etapa en la que se devalúa sorpresivamente la recompensa apetitiva).

El procedimiento típico de CNS consumatorio (CNSc) consiste en ensayos diarios de 5 minutos en el que se coloca a los animales en una caja de condicionamiento con un bebedero. En la condición experimental el bebedero, en la fase pre-cambio, contiene una solución de sacarosa al 32% (condición de alto valor de incentivo) que se intercambia por una solución al 4% en la fase post-cambio. Se compara entonces el consumo de la solución de sacarosa de los animales experimentales en la fase post-cambio con los sujetos control, cuyo bebedero siempre contiene solución al 4% (Flaherty, 1996). El resultado observado típicamente en estas condiciones es que los animales experimentales consumen menos solución azucarada 4% que los controles durante los primeros ensayos de la fase post-cambio y, hacia el final del entrenamiento, el consumo de ambos grupos se equipara.

Por otro lado, cuando la variable que se mide es el desempeño del animal en una tarea operante, hablamos de CNS instrumental (CNSi). En este caso, se suele utilizar un corredor recto (e.g., Crespi, 1942), y se mide el tiempo que tarda el animal en recorrerlo. Los animales experimentales, típicamente muestran una adquisición más rápida de la respuesta instrumental que los controles durante la fase pre-cambio (cuando los experimentales reciben una recompensa de mayor valor), mientras que en la fase post-cambio, a partir del segundo ensayo se comienza a observar un deterioro de la respuesta instrumental en el grupo experimental, con un desempeño por debajo de la respuesta del grupo control (a pesar de que ambos grupos en esta etapa están recibiendo exactamente la misma recompensa) (Crespi, 1942). Una diferencia importante entre ambos procedimientos consiste en que, en el caso del CNSi, los efectos se producen como una respuesta anticipatoria. Los animales incrementan el tiempo de recorrido como consecuencia de la devaluación sufrida en los ensayos anteriores, es decir que el efecto de CNSi sólo podría empezar a observarse a partir del segundo ensayo posterior a la devaluación. En cambio, el efecto de CNSc es una reacción inmediata a la devaluación de la recompensa y el efecto se observa desde el primer ensayo post cambio (que suele ser el pico del efecto).

En resumen, la *Teoría de la Frustración* explica cada uno de los efectos paradójicos del reforzamiento descritos en esta sección como resultado de la aparición de emociones de valencia negativa. En el CNS, la frustración produce un cambio brusco de la estrategia comportamental, en un ambiente cuyas claves contextuales predicen un refuerzo de alto valor que difiere del obtenido finalmente. Este fenómeno involucra además otras funciones psicológicas relacionadas con sus respectivos sustratos neurales. Los animales deben evaluar diversas características de los refuerzos, comparar los distintos valores de estos y actuar en función de esas diferencias (Flaherty, 1996). A su vez, en la fase post-cambio ocurren dos tipos distintos de aprendizaje que involucran potencialmente distintos sistemas de memoria. Los sucesivos ensayos reforzados con el refuerzo pequeño inducirán una actualización de la expectativa. Es decir, una actualización de la asociación entre el contexto, antes asociado a un refuerzo grande, con el refuerzo ahora pequeño. A este aprendizaje de asociación refuerzo-contexto se lo considera de tipo “alocéntrico”, dado que se refiere al entorno del sujeto. Los procesos de *frustración primaria* y luego *contracondicionamiento*, en cambio, son de tipo “egocéntrico”, ya que el organismo aprende algo sobre sí mismo y su estado emocional (Papini, 2003).

1.3 Estudio de las emociones en las ciencias del comportamiento y en el CNS

Las emociones han sido objeto de estudio en todas las ciencias del comportamiento, dada su relevancia en la modificación de la conducta y en su valor adaptativo, generando un interés particular dentro de la psicología experimental comparada. Anderson & Adolph (2014) definen las emociones como aquellos estados cerebrales internos que son desencadenados por estímulos intrínsecos o extrínsecos específicos (por ejemplo, una amenaza directamente percibida o un recuerdo de esa amenaza). Estos estados impulsan comportamientos característicos conservados filogenéticamente que duran más que la presencia de los estímulos y que generalmente son observables. Históricamente, los estados emocionales se han clasificado según su valencia e intensidad (Russell, 1980). La valencia puede ser positiva cuando la emoción se percibe como agradable para el sujeto, o negativa cuando se habla de estados desagradables como el miedo, la ira o la tristeza (Friedrickson, 1998; Russel, 1980). En cuanto a sus bases neurales, el sistema

límbico (que comprende una variedad de estructuras que incluyen áreas corticales, talámicas e hipotalámicas, así como el complejo amigdalino, el núcleo accumbens y el hipocampo), ha sido considerado clásicamente el mediador central de los procesos emocionales. Redes específicas dentro de estas áreas tienen la capacidad de codificar estímulos de valencia específica (Gore, 2015; Redondo, 2014). Por ejemplo, se ha encontrado que dentro de la amígdala existen circuitos específicos que muestran activación diferencial ante estímulos que predicen la aparición de eventos de valencia negativa o positiva (O'Neill et al 2018). A su vez, pueden codificar la intensidad del estímulo (Anderson et al., 2003; Small et al., 2003).

Existen una serie muy amplia de investigaciones con múltiples niveles de análisis (comportamental, fisiológico, farmacológico y neurocomportamental) que respaldan la idea propuesta en la *Teoría de la Frustración* de que el CNS es un efecto derivado de una respuesta emocional de valencia negativa. Por ejemplo, Tinklepaugh (1928), realizó un experimento en el que monos (*Macacus cynomologos*) miraban cómo un experimentador colocaba una banana debajo de una taza y luego descubrían que en realidad debajo había lechuga (en el intervalo de retención, el investigador cambiaba el refuerzo para estudiar las representaciones de los estímulos que hacía esa especie). Los animales miraban la lechuga, pero no la aceptaban, y comenzaban a buscar la banana en la cercanía de la taza, como así también vocalizaban de manera agresiva. A su vez, se ha observado que la devaluación de una recompensa en un protocolo de CNSc, provoca en ratas un aumento de conductas como locomoción, *rearing* o exploración vertical (pararse en las dos patas traseras) y una disminución de los eventos de acercamiento al comedero (Pellegrini & Mustaca, 2000). Estos comportamientos son interpretados como un aumento de la conducta de escape, que según la *Teoría de la Frustración*, se presenta como una expresión de la aversividad del contexto donde se experimentó la degradación del incentivo. En este sentido, Daly (1974) observó que las ratas aprendieron a escapar de estímulos previamente emparejados con omisiones de recompensa, lo que demostraría que perciben la omisión de la recompensa como un evento aversivo.

A su vez, Flaherty et al. (1985) encontraron que, luego de la devaluación de una recompensa de solución azucarada, aumentaba el nivel de corticosterona en sangre en el segundo día luego de la devaluación. La corticosterona es un glucocorticoide, asociado a la respuesta de estrés. Se espera que los sujetos que experimentan algún tipo de estrés, incluyendo dolor, novedad y señales de estímulos

aversivos, presenten niveles aumentados de esta hormona. Por otra parte, la administración sistémica de corticosterona durante la fase post-cambio, aumenta el efecto de CNSc (Bentosela et al., 2006). Al mismo tiempo, se observó que los niveles de ACTH (adrenocorticotrofina; hormona que se libera ante situaciones de estrés o en presencia de estímulos aversivos) también se elevaron después de la primera y segunda sesión de devaluación de sacarosa del 32% al 4% (Pecoraro et al., 2009). Además, las ratas expuestas a la devaluación de la recompensa también mostraron un aumento en la temperatura corporal (dependiente de niveles altos de corticosterona); este cambio se atenuó mediante una adrenalectomía (Pecoraro et al., 2007).

Por otra parte, el CNSc y el CNSi se reducen o eliminan con la administración aguda de ansiolíticos benzodicepínicos, como el clordiazepóxido, midazolam, flurazepam y diazepam (Becker, 1986; Flaherty et. al 1996; Liao & Chuang, 2003; Mustaca et al., 2000; Ortega et al., 2014). El hecho de que este grupo de psicofármacos reduzca o elimine los efectos de CNS sugiere que es necesaria una respuesta emocional negativa o de estrés para que ocurra el efecto. De forma similar, se ha encontrado que el etanol también reduce el CNSc cuando se administra antes de la segunda sesión de devaluación (Becker & Flaherty, 1982). A su vez, se ha encontrado que los sujetos aumentan su preferencia por la ingesta de etanol luego de la devaluación de la recompensa, lo cual ha sido propuesto como un modelo de automedicación (Manzo et al., 2015). De la misma manera, las ratas prefieren una solución de clordiazepóxido (un fármaco ansiolítico) en el período posterior a la devaluación de la recompensa (Manzo et al., 2015).

Elliott (1928) planteó que el deterioro en el desempeño en el corredor recto, luego del cambio de reforzador a un tipo menos preferido, se podía deber a dos motivos: (1) “un trastorno emocional de algún tipo” y/o (2) aparición de conductas de búsqueda del reforzador previo. Es decir, que el efecto de CNS podría deberse a la aparición de conductas que compitan con el consumo de solución (en el caso del CNSc) o con alcanzar el compartimiento meta (en el caso del CNSi). Así, ésta sería una explicación alternativa que no involucra necesariamente una respuesta emocional. Flaherty et al. (1978), intentaron probar las hipótesis de Elliott utilizando el paradigma de CNSc en un *open field* o campo abierto. Para esto, se entrenó a los sujetos en el *open field* con un bebedero que contenía una solución de sacarosa de 32% que fue devaluada al 4%. El cambio estuvo acompañado a su vez por la

introducción de cuatro nuevos bebederos con la solución de 4%. Los resultados indicaron que los animales del grupo experimental (los devaluados): (i) tenían significativamente menos probabilidad de probar de un nuevo bebedero en comparación con el grupo control (que siempre recibieron la solución del 4%), y (ii) mostraban además mayor actividad locomotora y mayor *rearing*. Los autores discutieron que, si la hipótesis de búsqueda fuera cierta, las ratas experimentales se hubieran acercado más veces a los bebederos, esperando encontrar la recompensa anterior, lo que no sucedió. A su vez, se ha observado que la disminución del consumo de una solución de sacarosa luego del cambio se expresa en animales con restricción de movimiento (López Seal et al., 2013), lo cual es una evidencia adicional de que la disminución del consumo luego de la devaluación no está relacionada al aumento de otras conductas competidoras.

Por otro lado, en el caso del CNSc se ha estudiado el comportamiento social luego de la devaluación de una recompensa y se ha encontrado que si los sujetos experimentales son expuestos a un conespecífico expresan patrones comportamentales de sumisión y de pérdida de dominancia (Mustaca et al., 2000). A su vez, en otros estudios utilizando procedimientos instrumentales se halló que los animales respondían con mayor agresividad cuando eran expuestos a la omisión o decremento de reforzadores, distinto a lo que sucede en el CNSc (Mustaca, 2018). Estas disociaciones entre los procedimientos consumatorios e instrumentales se observó en otros fenómenos paradójicos del reforzamiento (Mustaca et al., 2009). Al mismo tiempo, se ha encontrado en roedores, de forma similar a lo que sucede en primates, que las omisiones de recompensa pueden provocar vocalizaciones -de baja frecuencia- (que están vinculadas a estados emocionales negativos), lo que sugiere que esa experiencia es emocionalmente negativa (Amsel et al., 1977; Binkley et al., 2014).

En resumen, si bien no existe una variable puntual o un resultado experimental en particular que demuestre que el efecto de CNS es resultado de la activación emocional, sí existen múltiples observaciones que van en este sentido (Dudley & Papini, 1996; Papini, 2014).

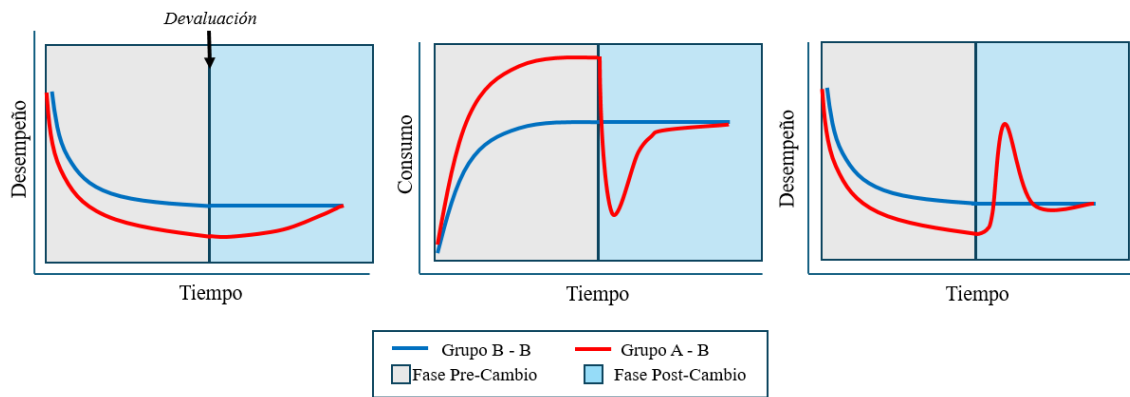


Figura 1.2. Gráficos idealizados de los efectos comportamentales de la devaluación sorpresiva de una recompensa. A la derecha se observa una respuesta típica de Contraste Negativo Sucesivo instrumental. En el centro se muestra una respuesta típica de Contraste Negativo Sucesivo consumatorio. A la izquierda se observa una respuesta de ajuste a la nueva recompensa sin efecto de contraste. B=Refuerzo bajo. A=Refuerzo alto.

1.4 Análisis comparado del CNS

Una de las características más importantes del fenómeno de CNS es su aparición aparentemente reciente en la historia filogenética, ya que parece ser un efecto exclusivo de mamíferos. Estudios en peces, anfibios y reptiles indican que un cambio sorpresivo de recompensa grande a una pequeña es seguido por un ajuste gradual del desempeño (Figura 1.2, izquierda), por lo que no se evidencia el CNS (ver por ejemplo, Lowes & Bitterman 1967; Muzio et al., 2011; Papini, 1997; Papini et al., 1995). Es decir, muestran un ajuste que sigue una regla simple de fortalecimiento-debilitamiento de la respuesta con relación al refuerzo. En estos grupos de animales se observa solo el efecto aloentróico del aprendizaje (Papini, 2003) luego del cambio en el refuerzo, por lo que se ajusta el comportamiento de acuerdo a la actualización del nuevo incentivo, pero no se presentan los efectos egocéntricos que sí se observan en mamíferos y provocan el deterioro típico de la respuesta de CNS.

Estudios con peces, anfibios y reptiles de otros fenómenos paradójicos han mostrado resultados en esta línea. Al igual que ocurre en mamíferos, durante la adquisición estos grupos de animales incrementan su respuesta en función de la magnitud de reforzamiento. También se verifica una mayor respuesta con reforzamiento continuo en comparación con reforzamiento parcial. Sin embargo, en la extinción luego de una adquisición con un mayor refuerzo o con refuerzo parcial, peces, anfibios y reptiles parecen diferir de los mamíferos. Por ejemplo, la extinción

es más rápida después de reforzamiento parcial que después de reforzamiento continuo, y más rápida luego de un entrenamiento con reforzamientos pequeños que después de un entrenamiento con magnitudes grandes. Además, no se observan cambios en la conducta cuando la magnitud o calidad de reforzamiento es disminuida. Esta descripción es válida para peces (Couvillon & Bitterman, 1985; González et al., 1962; Longo & Bitterman, 1960; Lowes & Bitterman, 1967; Schutz & Bitterman, 1969), sapos (Muzio et al.; 1992, 1994, 2006; Papini et al., 1995; Puddington et al., 2018), tortugas (Ishida & Papini, 1993; Papini & Ishida, 1994) e iguanas (Graf, 1972).

Los mecanismos de frustración podrían haber evolucionado en los mamíferos a partir de mecanismos de condicionamiento del miedo (Papini, 2003). Estos mecanismos permiten a los organismos adaptarse a cambios inesperados en su ambiente, aumentando su capacidad para enfrentar situaciones adversas y ajustar su conducta a un entorno cambiante. El efecto de CNS que se estudia en condiciones controladas en un laboratorio, podría estar reflejando un mecanismo psicológico de alto valor adaptativo, que en condiciones naturales, permite a los animales una mayor flexibilidad comportamental. En lugar de persistir en una conducta que solía ser muy efectiva, la frustración induciría un cambio brusco de la respuesta, lo que permite la emergencia de nuevas estrategias.

Estudios comparados en términos ontogenéticos mostraron que en ratas jóvenes hay una disociación temporal en la manifestación de fenómenos paradójicos. Ratas de 15 días de edad presentan evidencia del efecto del refuerzo parcial en la extinción, pero no presentan efecto de contraste, que sólo aparece a partir de los 24-25 días de edad (Amsel, 1992). Estudios más recientes demostraron que desde al menos los 8 días post nacimiento, las ratas son capaces de discriminar entre diferentes concentraciones de sacarosa, prefiriendo la solución de mayor concentración, y hasta la segunda semana de vida los sujetos no muestran efecto de contraste luego de una devaluación sorpresiva (Suarez et al., 2012). A su vez, en ese mismo trabajo se comprobó que las ratas de hasta 16 días post nacimiento tampoco expresan el efecto de la *magnitud del refuerzo en la extinción* (Suarez et al 2012).

En los mamíferos, la Corteza Prefrontal (CPF) ejerce un control modulador (*Top-Down*) de estructuras subcorticales y de otras estructuras corticales. Esta función es, en cierto sentido una característica distintiva de los mamíferos. En ratas, la maduración postnatal de la CPF se da de forma progresiva, de modo que ésta

adquiere funciones de forma gradual (Yang & Tseng, 2021). Así, los mencionados estudios comparados, tanto a nivel filogenético como a nivel ontogenético, enfatizan la necesidad de entender el funcionamiento de la CPF en tareas de CNS como un fenómeno paradójico del reforzamiento.

1.5 Expectativa, motivación y esfuerzo de respuesta en el CNS

El efecto de la manipulación de distintos parámetros de entrenamiento sobre el aprendizaje ha sido motivo de estudio a lo largo de la historia de las ciencias del comportamiento, incluyendo la psicología experimental y las neurociencias. Hasta el momento, en el CNSi no ha sido estudiado exhaustivamente cuáles son las condiciones mínimas necesarias para ser capaz de observar el efecto. La manipulación sistemática de distintas condiciones de entrenamiento además, permite comprender mejor aspectos psicológicos del fenómeno como son la expectativa, la motivación y la valoración relativa de un incentivo.

Para que ocurra el efecto de CNS es crítico que los sujetos formen una expectativa de recibir un reforzador de alto valor. En este caso, el término *expectativa* describe el fenómeno interno que sucede en un organismo cuando repetidamente es expuesto a las mismas condiciones y se enfrenta a claves contextuales que predicen un evento. Al comienzo de cada sesión de entrenamiento, el sujeto recurre a la memoria de eventos similares cercanos en el tiempo, y en base a esta memoria puede predecir el resultado o consecuencia de su accionar. En la etapa pre-cambio, los sujetos forman una expectativa de recibir un reforzador de alto valor hedónico, en base a su propia experiencia en ese contexto particular. En el caso del CNS, la expectativa puede ser manipulada modificando de alguna manera la experiencia previa del sujeto con el contexto y el reforzador (por ejemplo, aumentando la cantidad de ensayos pre-cambio). Por otro lado, la expectativa debería reducirse también si en la fase pre-cambio se utiliza un programa de refuerzo parcial. En efecto, cuando se utiliza un protocolo de este tipo se observa una reducción del efecto de CNSc (Pellegrini et al., 2004). Bajo condiciones de refuerzo continuo, los sujetos desarrollan una expectativa fuerte y consistente de recibir la recompensa cada vez que realizan la conducta. En contraposición, bajo un régimen de reforzamiento parcial, la expectativa de recibir una recompensa en cada ensayo se debilita, ya que los sujetos aprenden que no siempre recibirán la recompensa. Esta reducción en la

expectativa puede disminuir la discrepancia entre lo que se espera y lo que realmente se recibe, atenuando así la reacción negativa o la frustración cuando ocurre la devaluación de la recompensa. Sin embargo, este efecto puede ser resultado no sólo de la reducción de la expectativa, sino también del proceso de *contracondicionamiento* de la frustración que ocurre en el reforzamiento parcial (Amsel, 1992). Ambas explicaciones no son mutuamente excluyentes.

La formación de una expectativa es fundamental para la aparición del fenómeno de CNS, ya que según la teoría de Amsel, la violación de la expectativa generada por el refuerzo en ese contexto en particular, provocaría la aparición de las emociones negativas que dan lugar al deterioro de la respuesta. Al mismo tiempo, estudios donde usaron claves predictivas del refuerzo encontraron que cuando los sujetos podían predecir la recompensa utilizando claves contextuales (por ejemplo, paneles de colores asociados al refuerzo grande o pequeño), moderaban sus respuestas emocionales luego de la devaluación, así como también disminuía el efecto de contraste (Binkley et al., 2014; Daniel et al., 2008). Es decir, si la clave asociada al refuerzo grande se quitaba previamente a la devaluación, los sujetos no tenían la certeza de obtener una recompensa alta y, por lo tanto, no mostraban una respuesta clara de frustración. A su vez, la memoria del refuerzo recibido previamente puede ser afectada por fármacos, y esto también afecta la aparición y la magnitud del fenómeno de CNS. Por ejemplo, la administración de drogas que mejoran la memoria luego del primer ensayo post-cambio en un protocolo de CNSc retardaron la recuperación de la respuesta consumatoria, es decir, aumentaron el efecto de contraste (Bentosela et al., 2006; Norris et al., 2011; Ruetti et al., 2009). Esto indica que se potencia la memoria “egocéntrica” que refuerza el estado emocional negativo referido a la devaluación, y, por lo tanto, de alguna forma, interfiere con la actualización de la memoria “alocéntrica” que atenuaría el efecto de CNSc (porque tendería a coincidir el incentivo esperado con el obtenido).

La motivación es el motor de la acción, en el sentido que dirige la conducta. Puede entenderse como el proceso que explica el inicio, dirección, intensidad y perseverancia de la conducta dirigida hacia el logro de una meta (Salamone et al 2024). Según Hull (1943) en su libro “*Principios del Comportamiento*”, la motivación se divide en primaria (o impulso) y de incentivo. La privación de alimento (u otro tipo de necesidad fisiológica) genera un impulso biológico que se denomina motivación primaria, y los reforzadores tienen la propiedad de disminuir

ese impulso. Este supuesto se desarrolló en su “*Teoría de reducción del impulso*”. Por otro lado, la motivación de incentivo se refiere a que algunos reforzadores resultan más atractivos comparados con otros o con sí mismos en diferentes momentos, en condiciones iguales de privación. Estas definiciones resultan interesantes desde el punto de vista homeostático, y fueron el puntapié inicial para la comprensión de estos parámetros fundamentales en el estudio del comportamiento, aunque existen algunos resultados experimentales que no reproducen los supuestos. Por ejemplo, Balleine (1992) investigó el efecto de degradar un refuerzo alimenticio en grupos de animales con diferente grado de privación. Después de entrenar a ratas hambrientas para presionar una palanca por pellets de alimento, comparó el rendimiento en la extinción con animales no hambreados. Contrario a la predicción de la teoría del impulso, el nivel de privación en la prueba no tuvo ningún efecto detectable en el rendimiento durante la fase de extinción.

El corredor recto es un dispositivo comúnmente utilizado para analizar la motivación de los sujetos (e.g., Crespi, 1942; Elliot, 1928), registrando el tiempo que tardan en recorrerlo de extremo a extremo para obtener una recompensa. Representa una tarea sencilla para los individuos, especialmente para ratas, por lo que los cambios del desempeño pueden ser fácilmente adjudicados a una variación de la motivación, más que a una falla o un error del individuo. En la fase pre-cambio del CNSi, la motivación llevaría a los sujetos del grupo experimental a tener un desempeño mejor en el corredor recto que los del grupo control (los cuales reciben un refuerzo menor). Esta diferencia de desempeño entre sujetos experimentales y controles puede ser explicada por la *ley del efecto*, que predice que la tasa de adquisición del aprendizaje es mayor cuando la recompensa es de mayor valor. En la etapa post-cambio, el CNSi como efecto paradójico, pone a prueba esta regla lineal y adiciona la dimensión emocional de la conducta, cuando ante a una misma recompensa, el grupo experimental y el control en la etapa post-cambio se comportan de manera diferente. Esto podría ser explicado a partir de la motivación de incentivo, explicada por Hull, y en este aspecto, se podría considerar a la motivación como ligada directamente al valor relativo que se le asigna al refuerzo. De esta manera, se puede desprender que la motivación es un factor fundamental para la aparición del efecto de CNS, ya que los sujetos muestran un deterioro brusco en la motivación por obtener la recompensa en la etapa post-cambio (que se expresa, por ejemplo, como un aumento en el tiempo de respuesta en el corredor recto).

Los organismos en condiciones naturales deben sopesar constantemente el valor del incentivo en relación con el esfuerzo que les requerirá obtenerlo. Cualquier estrategia de forrajeo debe requerir una relación eficiente entre la inversión de energía y las calorías obtenidas para no entrar en un déficit calórico. Así, el valor de un incentivo estará determinado, no sólo por la expectativa y la motivación, sino también por el *esfuerzo requerido*. En condiciones de laboratorio, se asume que un reforzador posee un “alto valor de incentivo” si la respuesta asociada se elige más frecuentemente en un ensayo de elección libre en el cual se pueden ejecutar también otras conductas, y a su vez, si esa conducta incrementa su tasa de respuesta (Inzlicht et al., 2018). Una conducta instrumental eficiente requiere que sea sensible a la relación entre respuesta y reforzador, es decir, los animales tienden a simplificar la conducta para minimizar el costo. El esfuerzo corresponde a la intensidad del trabajo mental o físico que los organismos aplican para lograr algún resultado (Inzlicht et al., 2018). Según las teorías clásicas, se indican dos grandes principios que explican la relación entre las propiedades de la respuesta instrumental en este aspecto y el aprendizaje: en primer lugar, el esfuerzo puede representar un efecto negativo sobre el comportamiento; pero por otro lado, el esfuerzo puede también tener un valor positivo sobre el comportamiento. El primero, indica que las respuestas se dan en el marco de la “*Ley del menor esfuerzo*” (Hull, 1943; Inzlicht et al., 2018; Pinkston, 2021). Tanto en animales humanos como no humanos actuarán de manera que minimicen los costos de comportamiento o que, dada la opción de trabajar más o menos por el mismo objetivo, trabajarán menos. Se hace alusión a la “*Hipótesis aversiva*”, en la que el valor de cada estímulo se juzgue en relación con el esfuerzo requerido para obtenerlo. Entonces, aumentar el esfuerzo tiende a tener un efecto reductor en el comportamiento, lo que puede implicar alguna función negativa o aversiva (Killeen, 1988). Una segunda posibilidad es que, si se ha realizado un gran esfuerzo para obtener una recompensa, es posible que se juzgue el valor de ese estímulo como relativamente mayor que el valor de un estímulo similar. Se podría interpretar tal efecto como una forma de contraste (Flaherty, 1996) o como un alivio. En tal caso, se podría esperar que se desarrollara una preferencia por el estímulo que requirió un mayor esfuerzo. Una amplia variedad de estudios demostró este fenómeno en modelos animales y en humanos. Por ejemplo, Lydall et al. (2010) entrenaron ratas para que presionaran una palanca para obtener 60 segundos de acceso a una solución azucarada, y midieron la cantidad de veces que lamían el

bebedero. Se separaron a los sujetos en dos grupos. Uno que debía realizar 50 presiones en la palanca (*high effort*) y otro grupo que debía realizar solamente 10 (*low effort*). Adicionalmente, se agregaron otros dos grupos que no debían realizar la tarea instrumental, pero pasaban el mismo tiempo en la caja de condicionamiento para recibir los mismos 60 segundos de acceso a la solución azucarada. Los resultados indicaron que aquellos sujetos del grupo *High effort*, respondieron más veces (es decir, hicieron más *licking*) que los individuos del grupo *Low effort*, y a su vez, esta tendencia se mantuvo en los grupos que debían esperar para recibir la solución. Estos resultados parecen indicar, que los animales que debían realizar un mayor esfuerzo para obtener la recompensa le otorgaron un mayor valor a ese incentivo que se expuso en el aumento de la respuesta instrumental. La forma más simple de explicar estos resultados se da en el marco de los postulados de Flaherty (1996) sobre el CNS, en los que apunta que “en contraste con el estado afectivo negativo producido por el esfuerzo (u otros estados aversivos como el dolor), los objetos encontrados después de haber realizado un esfuerzo son percibidos como más valiosos”.

Por lo tanto, el CNS resulta un paradigma fundamental para estudiar el valor relativo del incentivo en base a las dimensiones del aprendizaje nombradas previamente: expectativa, motivación y esfuerzo de respuesta. A pesar de la larga historia de experimentos sobre el efecto de CNSi, hasta el momento falta en la literatura un análisis sistemático que incluya la manipulación de estos parámetros claves asociados al entrenamiento, como sí ya se ha realizado para el caso del CNSc (Flaherty, 1996; Papini & Pellegrini, 2006). Al mismo tiempo, se han utilizado una variedad de protocolos que han producido resultados dispares (e.g., Binkley et al., 2014; Crespi, 1942; Flaherty & Kelly, 1973; Papini & Pellegrini, 2007). Por este motivo, teniendo en cuenta las consideraciones previamente descritas, en el desarrollo de esta Tesis se propuso obtener un protocolo robusto del efecto de CNSi a fin de ser utilizado posteriormente en el estudio de las bases neurales del fenómeno.

1.6 Estado de desarrollo del estudio de las bases neurales del CNS

La mayor parte de los estudios de bases neurales del CNS se han realizado mediante estudios de lesión permanente. Dichos estudios de lesión han sido descriptos en

detalle en una revisión reciente (Fernández et al., 2024). Brevemente, los resultados más importantes disponibles son los siguientes:

En el CNSc, lesiones en áreas relacionadas con la percepción gustativa, como el núcleo parabraquial y el tálamo gustativo, impiden el fenómeno de contraste consumatorio (Grigson et al., 1994; Reilly & Trifunovic, 1999; Sastre & Reilly, 2006). Lesiones en estructuras del sistema límbico, como la amígdala basolateral, también afectan el CNSc, aunque con resultados variables (Becker et al., 1984; Kawasaki et al., 2017), y la inactivación temporal del núcleo central de la amígdala reduce este efecto (Kawasaki et al., 2015). En el CNSi, hay menos estudios; pero sin embargo, se ha observado que lesiones en la amígdala central retrasan la recuperación (Salinas et al., 1996), y las lesiones hipocampales afectan sólo al CNSi y no al CNSc (Flaherty et al., 1998).

Lesiones en la corteza insular y orbitofrontal afectan la respuesta al valor relativo del incentivo en protocolos de CNSc (Lin et al., 2009; Ortega et al., 2013). En particular, se observó en la fase de pre-cambio que los animales lesionados del grupo 32/4 consumieron significativamente más solución que los animales del grupo 4/4. En la fase de post-cambio, los animales lesionados reducían progresivamente el consumo de solución hasta alcanzar los niveles de consumo de los sujetos control (Lin, et al., 2009). Es decir, que la lesión de la corteza insular no modificaba la respuesta al valor absoluto del incentivo, pero sí la respuesta al valor relativo. Existe un único estudio del efecto de la lesión de corteza orbitofrontal frente a la degradación del incentivo en una situación de CNSc (Ortega et al., 2013) donde los animales lesionados mostraron un efecto de contraste levemente menor que sus controles *sham*. Es decir, la lesión de esta estructura no impidió que los animales detectaran la modificación en el nivel de recompensa, como era esperado. En cuanto a la corteza prefrontal medial (CPFm; *mPFC* por sus siglas en inglés), Pecoraro et al. (2008) estudiaron la respuesta consumatoria de animales lesionados y *sham* en un protocolo que no incluía grupos de la condición control con refuerzo pequeño (4/4%). En este estudio, se observó una recuperación más rápida de los animales lesionados en comparación con los *sham*. Un segundo estudio (Ortega et al., 2013) incluyó a los grupos 4/4 *sham* y lesionados. Pero en este caso no se consiguió detectar efecto de la lesión al comparar a los grupos 32/4, aunque sí se observó que el consumo de solución azucarada era menor en el grupo 4/4 lesionado que en el control *sham* (la lesión de la CPFm afectó el consumo de la solución menos preferida en

animales que no sufrieron la degradación del incentivo). Por otro lado, se ha reportado que las lesiones por aspiración de la corteza cingulada anterior reducen el CNSi en una situación de corredor recto (Gurowitz et al., 1970).

Hasta el momento, los estudios sobre áreas corticales de ejecución y de procesamiento son escasos. En particular, los resultados de lesiones de la CPFm presentan resultados difíciles de interpretar, posiblemente debido a que es una estructura que recibe inervación de gran variedad de áreas y a su vez envía proyecciones a estructuras fundamentales para la ejecución del comportamiento. Por esta razón, su destrucción puede provocar respuestas diversas según el nivel y el tamaño de la lesión. Sin embargo, los estudios de esta región en otros paradigmas comportamentales (que serán revisados en el Capítulo 4 de la presente Tesis) sugieren que su participación en el CNS es sumamente relevante. Así, los experimentos sobre las bases neurales del efecto de CNS de esta Tesis se centran en esta región cerebral.

Objetivo General

El CNS es un efecto producido por la devaluación sorpresiva de la recompensa. Sin embargo, no siempre que se produce una devaluación del refuerzo observamos efecto de contraste. Por un lado, la magnitud de la devaluación debe ser lo suficientemente grande; por otro lado, la experiencia con el incentivo debe ser la necesaria para que los animales desarrollen la expectativa de recibir el refuerzo. Teniendo esto en cuenta, los objetivos generales de esta Tesis son:

- 1- desarrollar un procedimiento experimental robusto y replicable, manipulando los parámetros claves que se desprenden del marco teórico (expectativa, discrepancia y esfuerzo de respuesta).
- 2- Comenzar con el estudio del papel de la corteza prefrontal medial en el CNSi.

Tanto los estudios comparados como los estudios de lesión sugieren que la CPFm tiene un rol clave en el CNS. La actividad celular en esta región ha sido estudiada durante la fase post-cambio en el CNSc, pero no hay estudios de este tipo en el CNSi. Así, una vez identificados los parámetros de entrenamiento que permitan replicar de forma consistente el fenómeno de CNSi, se analizará la actividad cerebral registrada en la fase post-cambio de este procedimiento.

Finalmente, utilizando un paradigma de registro electrofisiológico, se analizará la respuesta de neuronas individuales de la CPFm frente a la devaluación sorpresiva de la recompensa mediante tetrodos intracerebrales.

Metodología General

Protocolo Experimental

Todos los experimentos de esta Tesis fueron realizados en el marco del paradigma del CNSi. Globalmente, más allá de las particularidades de cada experimento, los sujetos fueron asignados a la condición experimental o control y recibieron un entrenamiento que constaba de dos fases: Pre-cambio y Post-cambio (*Tabla 1*). Se define como etapa pre-cambio a aquellas sesiones de entrenamiento en la que los sujetos experimentales recibían el reforzador de mayor valor (recompensa grande), y etapa post-cambio en la que esa recompensa es devaluada (recompensa pequeña).

Tabla 1. Descripción de los experimentos de Contraste Negativo Sucesivo instrumental.

Grupo	Etapa Pre-cambio	Etapa Post-cambio
Experimental	Recompensa grande	Recompensa pequeña
Control	Recompensa pequeña	Recompensa pequeña

Sujetos experimentales

Se utilizaron ratas macho adultas experimentalmente *naïve* de la cepa Long Evans (*Figura 1.3*; peso inicial: 300-350 g), provenientes de la colonia del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME). Hasta los 60 días, los animales permanecían dentro del Bioterio Central alojadas en grupos de 3 a 5 animales en jaulas grandes. Luego, eran transportadas hasta un cuarto de mantenimiento (Vivario), donde eran alojadas individualmente con un ciclo de luz-oscuridad (12 hs luz-12hs oscuridad) y temperatura (23 °C) controladas. En este cuarto permanecían durante todo el tiempo de desarrollo del experimento. Cada sujeto fue utilizado solamente en un único experimento.



Figura 1.3. Sujeto experimental: Rata Long Evans.

Determinación de peso: En todos los experimentos se restringió el alimento, de forma que los entrenamientos se realizaran cuando los sujetos se encontraban entre un 80% y un 85% de su peso *ad libitum*. Para realizar la determinación de peso *ad libitum*, los animales una vez ingresados al vivario eran pesados a la misma hora durante 3 días seguidos, mientras tenían disponibilidad completa de alimento y agua. Con estos 3 pesos se realizaba un promedio, y de este promedio se calcula el 80% y el 85%. Con este dato se comenzaba la privación de alimento, que consistía en alimentar a los animales con una dieta de 4 pellets diarios hasta obtener el rango de peso necesario (procedimiento que tenía una duración de aproximadamente 7 días), y posteriormente eran compensados con la cantidad de pellets necesarios para mantener ese peso durante todo el experimento (esto podría variar entre animales, pero en general una dieta de mantenimiento consta de 8 pellets diarios). Todos los sujetos fueron pesados antes de cada sesión de entrenamiento para comprobar que se mantenían en ese rango. El agua de beber siempre se mantuvo *ad libitum*.

Aparato experimental: Corredor recto

Las ratas fueron entrenadas en una situación de corredor recto (*runway*). Este dispositivo, construido en chapa de zinc, consta de tres secciones: un compartimiento o caja de partida (40 cm de largo), un corredor (200 cm) y un compartimiento meta (40 cm), separadas por puertas guillotinas (así, el largo total del aparato es 280 cm; ancho de 20 cm). Las paredes tienen una altura de 30 cm, y todas las secciones están recubiertas por una tapa de Plexiglas transparente. En el extremo del compartimiento meta se encuentra un receptáculo-comedero donde se coloca la recompensa (micropellets Bioserv, 45 mg c/u); sobre el mismo, se encuentra un tubo de acrílico con un ventilador superior que permite la extracción y renovación del aire (*Figura*

1.4). El corredor recto posee fotosensores infrarrojos conectados a un programa de registro automático (MED-PC, Fairfax, VT) controlado por una computadora, que registra la latencia para abandonar la caja de partida, el tiempo de recorrido del corredor central, y el tiempo que el sujeto tarda en ingresar al compartimiento meta y acceder al comedero.

Procedimiento experimental general

Todos los sujetos que fueron incluidos en el protocolo de CNSi fueron pesados previamente a cada sesión de entrenamiento, y alimentados 30 minutos después de finalizar el último sujeto. Los entrenamientos se realizaron en la misma franja horaria durante todo el experimento. Siempre recibieron 2 sesiones de pre-entrenamiento, en dos días consecutivos. En estas sesiones los animales eran colocados en el set experimental dentro del corredor recto con todas las puertas abiertas, dejando que recorrieran libremente el aparato durante 15 minutos para habituarse a la situación de entrenamiento.

Inmediatamente después de estas sesiones de pre-entrenamiento se procedió con las sesiones de pre y post-cambio. Luego de cada sesión, el corredor recto fue limpiado con una solución de alcohol al 70%, y se esperaron 5 minutos entre cada sujeto experimental para disminuir lo más posible las marcas odoríferas.

Cada una de las sesiones de entrenamiento conservó la misma metodología general. Las sesiones comenzaban cuando los sujetos eran colocados en el compartimiento de partida del corredor recto, dando inicio al programa de la computadora que maneja las puertas y los sensores del corredor recto. De esta forma, se abría la puerta del comportamiento de salida y comenzaba a correr automáticamente el registro de la “Latencia de Partida”. Una vez atravesado el primer sensor del corredor, comenzaba a contabilizarse el “Tiempo de Recorrido”, que concluía cuando el sujeto atravesaba el sensor de la puerta del compartimiento meta. En ese momento se cerraba automáticamente la puerta del compartimiento meta y comenzaba a registrarse el “Tiempo de Llegada”. Una vez que el sujeto colocaba la cabeza en el comedero, se iniciaba el tiempo de reforzamiento (2 minutos). Pasado ese tiempo, los sujetos eran extraídos y devueltos a su caja hogar. Durante toda esta Tesis se denominará “Sesión” al evento diario de entrenamiento (separadas entre sí por intervalos de 24 hs.), mientras que se utilizará el término “Ensayo” para las repeticiones del entrenamiento dentro de una misma sesión. De

esta forma, se utilizarán en los distintos experimentos de esta Tesis entrenamientos del tipo “distribuido” (cuando se trata de sesiones de entrenamiento de un ensayo cada 24 hs.), y entrenamientos “masivos” (cuando se trata de sesiones de entrenamiento de más de un ensayo consecutivo, con iguales intervalos inter-sesión de 24 hs.). En el caso de los entrenamientos masivos, el animal esperaba 30 segundos en su caja hogar hasta reiniciar el siguiente ensayo. En el caso de los entrenamientos distribuidos, una vez en su jaula el animal era llevado nuevamente al vivario.

En caso de que los sujetos no completaran correctamente el primer ensayo de entrenamiento, se procedía a realizar un *ensayo guiado*. Esto consistía en acompañar suavemente con el movimiento al animal hasta el compartimiento meta. Si algún sujeto no completaba el recorrido del corredor por sus propios medios en tres sesiones consecutivas, se descartaba del experimento. La tasa de descarte no superó en ningún experimento el 10% del total de sujetos.

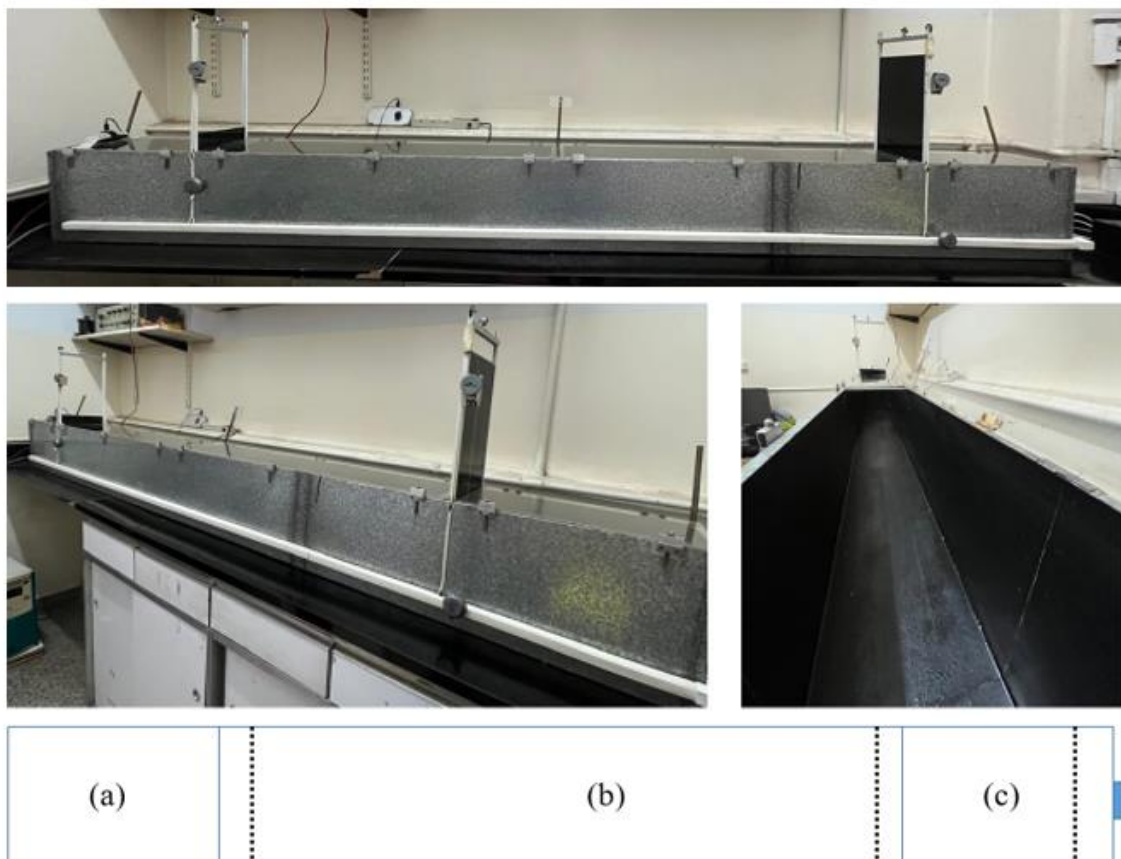


Figura 1.4. **Arriba:** Distintas vistas del aparato experimental: Corredor recto. **Abajo:** Diagrama del corredor recto. (a) Compartimiento de partida. (b) Pasillo o corredor. (c) Compartimiento meta. En línea punteada se observa la ubicación de los sensores fotoeléctricos. El rectángulo azul al borde de la caja meta representa el comedero.

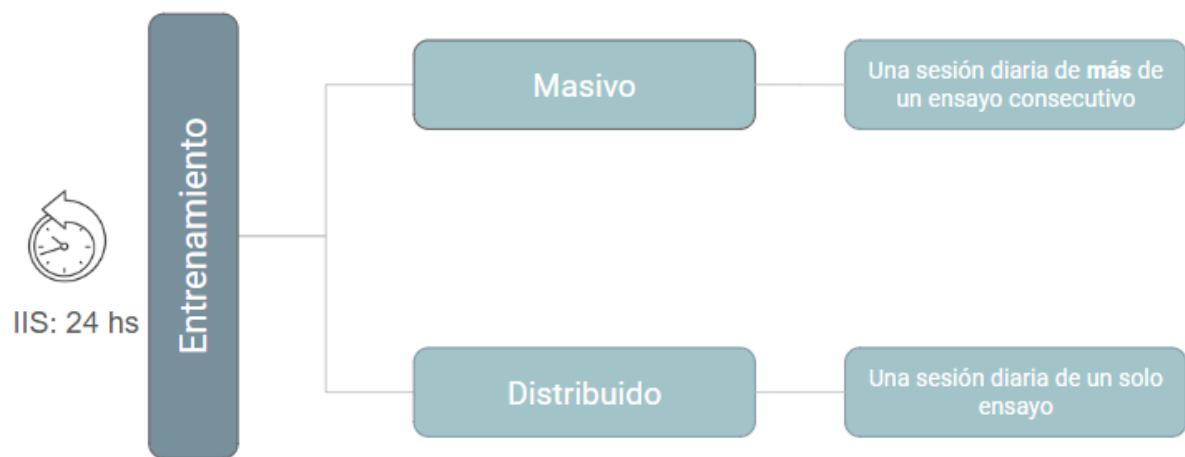


Figura 1.5. Esquemas de los tipos de entrenamiento (Masivo-Distribuido) utilizados en esta Tesis.

IIS: Intervalo inter-sesión.

Capítulo 2

Efecto de la pendiente del corredor recto en el fenómeno de CNSi

En esta serie experimental se ha propuesto estudiar el *efecto de la pendiente* del corredor recto en la aparición y/o la intensidad del fenómeno de CNS instrumental, como una manera de manipular el *esfuerzo de respuesta*. El corredor recto como aparato experimental, está ampliamente descrito como una herramienta para estudiar la motivación del sujeto para obtener una recompensa y el efecto reforzante de un incentivo (Ettenberg, 2009). Típicamente, en el extremo del corredor se coloca una recompensa alimenticia, como pellets o soluciones azucaradas, y el tiempo de recorrido del pasillo funciona como una medida indirecta de la motivación. Por ejemplo, se ha observado que el aumento de la concentración de sacarosa de soluciones colocadas en la caja meta, está directamente relacionado con el aumento en la velocidad de las ratas para recorrer el aparato (Flaherty, 1973). Incluso, este tipo de situación experimental también se ha utilizado para evaluar la motivación de los sujetos por otro tipo de recompensas. Hanmer et al. (2010) presentaron en la caja meta estímulos no alimenticios utilizados para enriquecimiento ambiental y observaron diferencias en el tiempo de recorrido, correspondiente a la preferencia de los animales por los objetos. La devaluación sorpresiva de la magnitud del refuerzo que ocurre en el CNS, altera la evaluación que hace el individuo sobre el valor del incentivo (Torres & Papini, 2017), y por lo tanto, la motivación por obtenerlo. Por ejemplo, en un corredor recto, los animales que sufren la reducción sorpresiva de un refuerzo empeoran de forma transitoria el desempeño de la respuesta instrumental, aumentando el tiempo de recorrido (Crespi, 1942).

Otro factor que afecta la evaluación que hace un individuo sobre un incentivo, es el esfuerzo que se requiere para obtenerlo. Se han propuesto hipótesis contradictorias para explicar cómo el esfuerzo de respuesta afecta la valoración del incentivo (ver Capítulo 1). Por ejemplo, un incentivo más costoso de obtener podría ser más valioso que el mismo incentivo si requiere menos esfuerzo. Así, al igual que ocurre en el efecto de la magnitud del refuerzo en la extinción, una conducta que requiere más esfuerzo, debería extinguirse más rápido que una que requiere menos esfuerzo. Distintos estudios muestran resultados en línea con esta predicción. Por ejemplo, Lawrence & Festinger (1962) manipularon el esfuerzo necesario para obtener una recompensa, alterando la inclinación de una rampa que conducía a una caja objetivo con comida. Encontraron que el aumento del esfuerzo reducía la resistencia a la extinción (es decir, se extinguía más rápido la respuesta instrumental).

También, Johnson & Viney (1970) utilizando un corredor recto con distintas inclinaciones, tuvieron los mismos resultados de extinción de la respuesta.

Otro grupo de trabajo (Conrad et al., 2020) estudió el efecto del esfuerzo de la respuesta mediante un esquema de reforzamiento de razón progresiva. Esto es, incrementar el número de palanqueos requeridos para recibir una recompensa a lo largo de los ensayos. Bajo este paradigma, se observó que las ratas palanquean más cuando la recompensa es mayor (5 pellets) que cuando es menor (1 pellet). A su vez, la extinción es más rápida en el primer caso que en el segundo. Al igual que ocurre con el efecto de sobre-entrenamiento, este efecto parece ser específico de los mamíferos, ya que palomas entrenadas con el mismo procedimiento, mostraron una extinción más veloz de la respuesta reforzada con un pellet que la reforzada con 5 (Conrad et al., 2020).

En un experimento previo realizado en nuestro laboratorio (Fernández et al., 2024; ver Exp. 1) se manipuló el número de ensayos pre-cambio en una tarea de CNSi en la cual los animales recibían un único ensayo por sesión diaria (entrenamiento distribuido). Los animales del grupo experimental debían recorrer el corredor recto para obtener 32 micropellets en la fase pre-cambio, que posteriormente eran reducidos sorpresivamente en la fase post-cambio a 4 micropellets. Se encontró que con 24 ensayos pre-cambio (es decir, 24 días de entrenamiento antes de la devaluación) se encontraba un efecto de contraste en el 4to. día luego de la devaluación de la recompensa, que se expresó como un deterioro en el desempeño en el corredor recto de los grupos experimentales en comparación con los controles. Por el contrario, utilizando 12 ensayos pre-cambio, el deterioro observado en la conducta no alcanzaba una significación estadística. En este sentido, es importante tener en cuenta que el efecto del CNS es el resultado de la violación de una expectativa, siendo la misma dependiente de la experiencia previa. Así, un mayor número de ensayos en los cuales se haya obtenido un incentivo grande incrementa la expectativa de que esto vuelva a ocurrir. La razón es que los animales predicen la aparición de aquel incentivo que fue recibido en un mayor número de eventos en el pasado cercano. En un protocolo distribuido, la experiencia previa de 12 ensayos con el reforzador no parece haber sido lo suficiente para formar en los sujetos del grupo experimental una expectativa que produzca un efecto de contraste robusto. Aumentar el esfuerzo de respuesta, implicaría incrementar el costo de obtener un refuerzo pequeño en la fase post-cambio. De acuerdo con *la hipótesis*

aversiva esto podría amplificar el efecto de contraste (es decir, podría disminuir aún más la respuesta comportamental, debido a una disminución del valor asignado al incentivo). Así, el primer experimento de esta serie se basó en esta lógica.

Por lo tanto, en el Experimento 1 de esta Tesis se evaluó entonces el efecto de manipular el esfuerzo de respuesta necesario para obtener una recompensa modificando la inclinación del corredor recto en una situación de CNSi. Así, se realizó el registro de variación del tiempo de recorrido ante la reducción sorpresiva de una recompensa apetitiva (nótese que esto difiere de la condición de los estudios mencionados previamente, donde se analizó el efecto sobre la extinción de la conducta; Johnson & Viney, 1970; Lawrence & Festinger, 1962). De esta manera, se espera también modificar la valuación del incentivo a partir del esfuerzo necesario para obtenerlo.

Como se describió en el primer capítulo, las respuestas emocionales ante cambios sorpresivos de la recompensa vuelven a la conducta de los mamíferos más impredecible, pues no siguen una regla general de respuesta instrumental guiada por la magnitud del refuerzo (como sí ocurre con el caso de las palomas descrito previamente). Por este motivo, es posible que los sujetos tengan un mejor desempeño cuando el refuerzo es mayor, a pesar de la dificultad de la tarea, pero que luego de la devaluación el grupo que fue expuesto a la mayor inclinación del corredor recto presente un mayor efecto de CNSi. En definitiva, el objetivo de utilizar una pendiente pronunciada fue evaluar si de esta forma se puede encontrar un efecto de CNSi, aún con un protocolo donde el efecto de contraste no alcanzó una magnitud suficiente para ser detectado (12 sesiones pre-cambio de un ensayo diario y 32 o 4 pellets como recompensa grande y pequeña, respectivamente).

Experimento 1: CNSi y Esfuerzo de respuesta

(Entrenamiento distribuido, 12 sesiones de pre-cambio, disparidad 32/4 pellets)

Materiales y métodos

Se usaron 43 sujetos distribuidos azarosamente en 4 grupos que diferían en la condición de la pendiente del aparato experimental (horizontal o inclinado 10 grados) y en el monto de recompensa que recibían por sesión en la etapa pre-cambio (32

micropellets como recompensa grande para los grupos experimentales y 4 micropellets como recompensa pequeña para los grupos controles) (Tabla 2.1).

Todos los sujetos recibieron 2 sesiones diarias de pre-entrenamiento de 15 minutos donde los animales exploraban libremente el corredor recto (sin recompensa). Luego de estas sesiones, se sucedieron 12 sesiones pre-cambio donde los sujetos recibieron la recompensa asignada a su condición (experimental o control). Las sesiones post-cambio tuvieron la misma dinámica operacional que las sesiones pre-cambio, pero en éstas todos los grupos recibían como recompensa 4 micropellets, igualando al grupo control. En este experimento se realizaron 10 ensayos post-cambio.

Se registró el tiempo de recorrido de cada ensayo (medido a través del programa de computadora mediante los fotosensores del corredor recto).

Tabla 2.1. Protocolo experimental pre y post-cambio del Experimento 1.

Grupo	Runway	Pre-cambio (12 sesiones)	Post-cambio (10 sesiones)
Experimental	Inclinado	32 micropellets	4 micropellets
Control	Inclinado	4 micropellets	4 micropellets
Experimental	Horizontal	32 micropellets	4 micropellets
Control	Horizontal	4 micropellets	4 micropellets

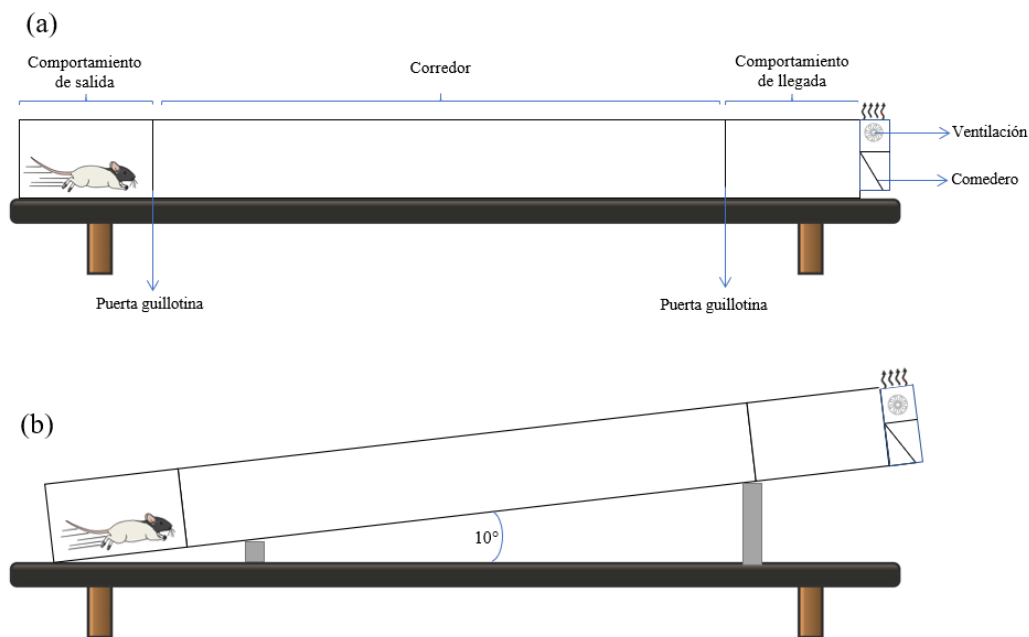


Figura 2.1. Esquema del corredor recto. (a) Posición Horizontal. (b) Posición Inclinada (10 grados).

Estadística

Los datos fueron transformados mediante la función Log10 para mejorar la normalidad. Para el análisis estadístico, se utilizó el software Graphpad Prism (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA) para Windows 10. Se utilizó la prueba estadística ANOVA de 2 y 3 vías con medidas repetidas. Previamente, se realizó una prueba de Mauchly de esfericidad. En los casos en los que la prueba de Mauchly indicaba que no era posible asumir esfericidad, se realizó una corrección de los grados de libertad mediante el criterio de Greenhouse-Geigger. Las comparaciones post-hoc se realizaron mediante el test LSD de Fisher. Los ensayos pre-cambio y los ensayos post-cambio fueron analizados en forma independiente. El mismo procedimiento de análisis estadístico se utilizó en todos los experimentos, para los datos de tiempo de recorrido.

Resultados

Etapa Pre-cambio:

Si bien la asignación de los sujetos a los 4 grupos fue completamente aleatoria y todos los grupos fueron entrenados en simultaneo, los datos se presentan por

separado para la condición Horizontal (*Figura 2.2*) e Inclinado (*Figura 2.3*) para facilitar la visualización. Adicionalmente, se presenta en la *Figura 2.4*, el promedio de los grupos 32/4 comparado con el promedio de los grupos 4/4. En todas las figuras se muestra la variable “tiempo de recorrido” (expresada en Log 10 de segundos) para todos los grupos a lo largo de las sesiones. La línea punteada indica el momento de la devaluación, por lo que las sesiones previas se denominan “pre-cambio” y las posteriores “post-cambio”. El tiempo de recorrido de los ensayos pre-cambio, se analizó mediante un ANOVA factorial de medidas repetidas para estudiar la interacción entre los factores Sesión, Condición (Experimental, Control) y Pendiente (Horizontal, Inclinado). Se encontró una interacción significativa entre las variables “Sesión” y “Condición” ($F_{(4,637; 368,392)} = 6.140; p < 0.001$). Los demás efectos no fueron significativos ($ps > 0.05$). El análisis post-hoc arrojó diferencias significativas en las sesiones 6, 9 y 12 ($p < 0.05$) entre la condición Experimental y Control (mostrando el grupo Experimental tiempos de recorrido menores).

Etapas Post-cambio:

El análisis factorial arrojó efectos significativos del factor “Sesión” ($F_{(7,370, 5,908)} = 3.606, p < 0.05$). Las demás interacciones no mostraron efectos significativos. Las comparaciones post hoc mostraron diferencias entre la sesión 17 y el resto de las sesiones post cambio ($p > 0.05$). Además, se observaron diferencias entre la sesión 13 y la 14, la 14 con la 19 y la sesión 15 con la 14 ($p < 0.05$).

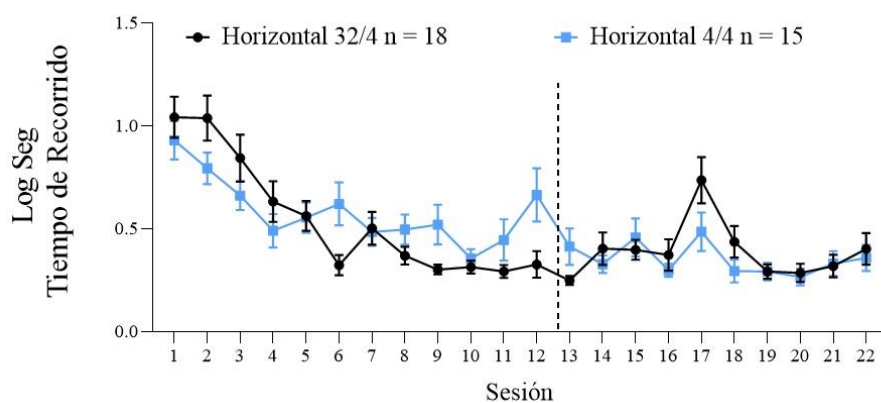


Figura 2.2. Tiempo de recorrido a lo largo de las sesiones (en Log s) de los grupos “Horizontal” del Experimento 1. Grupo experimental: Horizontal 32/4. Grupo control: Horizontal 4/4. La línea punteada determina la devaluación de la recompensa del grupo Horizontal 32/4.

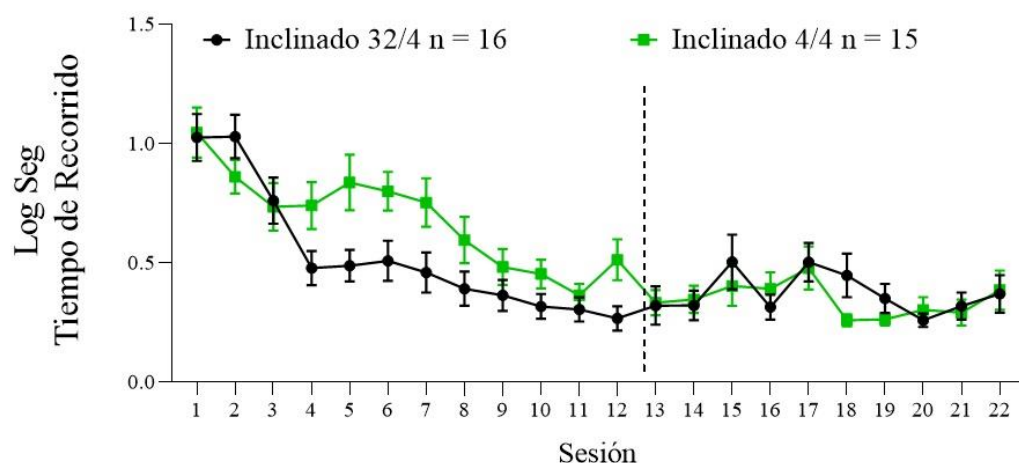


Figura 2.3. Tiempo de recorrido a lo largo de las sesiones (en Log s) de los grupos “Inclinado” del Experimento 1. Grupo experimental: Inclinado 32/4. Grupo control: Inclinado 4/4. La línea punteada determina la devaluación de la recompensa del grupo Inclinado 32/4.

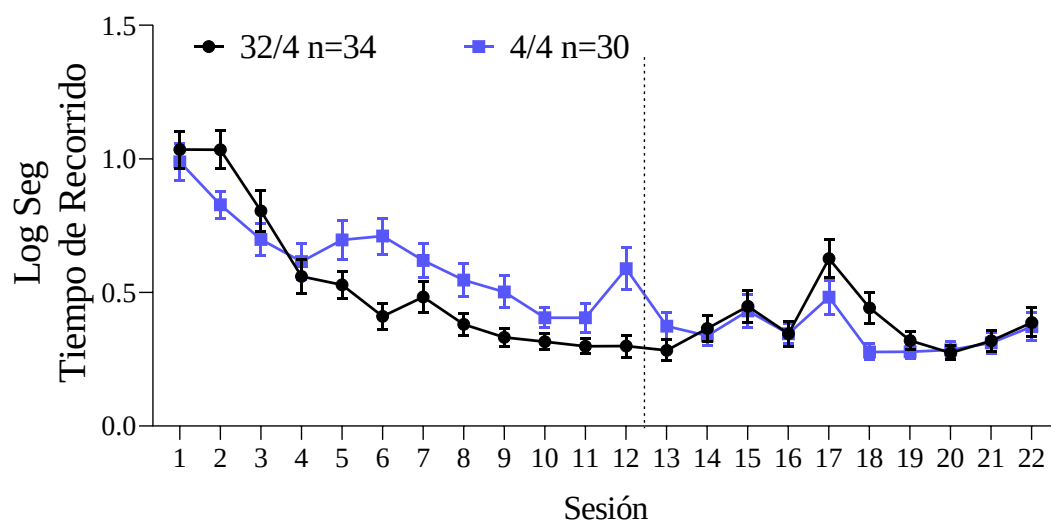


Figura 2.4. Tiempo de recorrido a lo largo de las sesiones (Log s) de los grupos 32/4 y 4/4 del Experimento 1. Se observan agrupados todos los sujetos de ambas condiciones (Horizontal/Inclinado). Grupo experimental: 32/4. Grupo control: 4/4.

Discusión

A lo largo de las sesiones pre-cambio, todos los grupos (Horizontal e Inclinado) disminuyen su tiempo de respuesta. Esto es esperable debido al efecto de la experiencia en la tarea, y a la alta motivación de los sujetos por obtener la

recompensa apetitiva. En la etapa post-cambio no se logró observar un efecto de CNSi en ninguno de los grupos experimentales. Tampoco se detectó un efecto al excluir el factor pendiente, dado que no se detectó interacción “Sesión x Condición”. El efecto de contraste instrumental se expresa como un incremento abrupto del tiempo de respuesta del grupo experimental en comparación con el grupo control luego de la devaluación de la recompensa. En este caso, se observó un aumento significativo del tiempo de respuesta en la sesión 17 con respecto a las previas y a las posteriores. Sin embargo, este efecto ocurrió tanto en los grupos experimentales como en los controles (*Figura 2.4*), por lo que es difícil atribuirlo a un efecto de CNSi. Variaciones de este tipo en el nivel de respuesta ocurrieron también en la fase pre-cambio. Por ejemplo, en la sesión 12 se observa un aumento en el tiempo de respuesta de los grupos 4/4 con respecto a días anteriores. Así, el aumento detectado el día 17 parece deberse a fluctuaciones aleatorias que ocurren cuando el refuerzo es pequeño en entrenamientos distribuidos (un único ensayo por sesión).

Como se mencionó anteriormente, se observó previamente que el efecto de CNSi ocurría cuando los animales recibían 24 sesiones distribuidas de pre-cambio, pero no cuando recibían 12 sesiones de pre-cambio (Fernández et al., 2024). Los resultados del presente experimento coinciden con esta observación. Más aún, en el presente estudio se utilizó una muestra grande de animales, por lo que es difícil concluir que el efecto no haya podido ser detectado por problemas en la potencia del estudio.

Este experimento parece sugerir que 12 sesiones pre-cambio no son suficientes para generar en los sujetos una expectativa del reforzador como para evocar la emergencia de emociones negativas ante su devaluación. La reducción en el tiempo de recorrido del *runway* que ocurre en la fase pre cambio, muestra que los animales conocen y predicen la aparición del refuerzo en el compartimiento meta. Sin embargo, dada la brevedad de los ensayos (entre 3 y 4 minutos), el entrenamiento en sí podría resultarles poco relevante. Interesantemente, bajo las mismas condiciones de entrenamiento, el aumento del número de sesiones (de 12 a 24) incrementaría la expectativa de recibir un refuerzo de alto valor, modulando la relevancia del refuerzo y la devaluación del mismo.

Ninguno de los tests estadísticos que evaluaron efectos de la inclinación del *runway* resultó significativos. Por lo tanto, la inclinación no afectó el desempeño de los animales en la fase pre-cambio ni en la fase post-cambio. Es más, la inclinación

ni siquiera afectó el desempeño cuando la recompensa era de tan sólo 4 pellets. Un mayor esfuerzo de respuesta, operacionalizado como una inclinación ascendente de 10 grados del corredor, no parece significar para los sujetos un factor que provoque una valuación diferencial del incentivo.

Para estudiar el cambio en la valuación del incentivo a partir del cambio en el esfuerzo para obtenerlo, se planteó el Experimento 2, que consideró a la pendiente en sí misma como condición de cambio sorpresiva durante el entrenamiento.

Experimento 2: CNSi y Efecto sorpresivo de la inclinación del corredor recto (Entrenamiento distribuido, 12 sesiones de pre-cambio, 32 pellets)

En este experimento se utilizó la pendiente del corredor recto como factor sorpresivo en sí mismo, luego de una etapa pre-cambio con el aparato en posición horizontal. Si la inclinación del *runway* es un factor relevante, se espera entonces obtener un deterioro del desempeño instrumental debido a que el reforzador obtenido por la tarea pasa a tener un menor valor de incentivo (ya que aumenta el esfuerzo de respuesta requerido para obtenerlo).

Materiales y métodos

Se usaron 14 animales distribuidos al azar en dos grupos que diferían en la condición de inclinación del corredor recto en la etapa pre-cambio (Inclinado u Horizontal). Al igual que en el Experimento 1, todos los sujetos fueron expuestos a dos días iniciales de pre-entrenamiento, y recibieron 32 micropellets como recompensa durante la etapa pre-cambio (que también consistió en 12 sesiones, una por día). Uno de los grupos entrenó en el corredor recto en condición Horizontal, mientras que el segundo grupo fue expuesto a la condición de Inclinación a 10 grados. En la etapa post-cambio, el primer grupo pasó también a entrenar con el corredor inclinado (grupo H/I), del mismo modo que el otro grupo (I/I) (*Tabla 2.2*). En esta etapa todos los grupos siguieron recibieron 32 micropellets como recompensa.

Tabla 2.2. Protocolo experimental del Experimento 2.

Grupo	Recompensa	Pre-cambio (12 sesiones)	Post-cambio (10 sesiones)
H/I	32 micropellets	Horizontal	Inclinado
I/I	32 micropellets	Inclinado	Inclinado

Resultados

Etapas Pre-cambio:

En la *Figura 2.5* se observa el tiempo de recorrido de los sujetos. El ANOVA de medidas repetidas para los factores Sesión y Grupo arroja solamente un efecto de la sesión ($F_{(2,186, 26,23)} = 20.48$, $p < 0.0001$). El análisis post-hoc mostró diferencias significativas entre la sesión 1 y todas las demás, exceptuando la sesión 2 ($ps < 0.002$); entre la sesión 2 y todas las demás ($ps < 0.02$); entre la sesión 3 y todas las demás, exceptuando la 2 ($ps < 0.09$); entre la sesión 4 y todas las demás ($ps < 0.002$); entre la sesión 5, la 8, 9 y la 12 ($ps < 0.02$); entre la sesión 6, la 9 y la 12 ($ps < 0.04$); y entre la sesión 7, la 9 y la 12 ($ps < 0.02$).

Etapas Post-cambio:

Para los ensayos post-cambio el ANOVA de medidas repetidas no detectó efectos significativos en ningún factor ($ps > 0.05$).

La inspección de la *Figura 2.5* sugiere que existe un efecto de la pendiente en el grupo H/I al inicio de la fase post-cambio. Este efecto parece estar restringido únicamente al primer ensayo post-cambio. Para estudiar específicamente este efecto, se realizó un análisis adicional en el que se compararon los grupos en las sesiones 12, 13 y 14. Para esto se realizó un ANOVA de dos vías de medidas repetidas. En este caso, se detectó un efecto de interacción Sesión x Grupo ($F_{(1;12)} = 6.847$; $p < 0.05$). El test de LSD Fisher mostró diferencias significativas entre los grupos para la sesión 13 ($p < 0.04$), y no para la sesión 12 ($p > 0.8$) ni la 14 ($p > 0.6$).

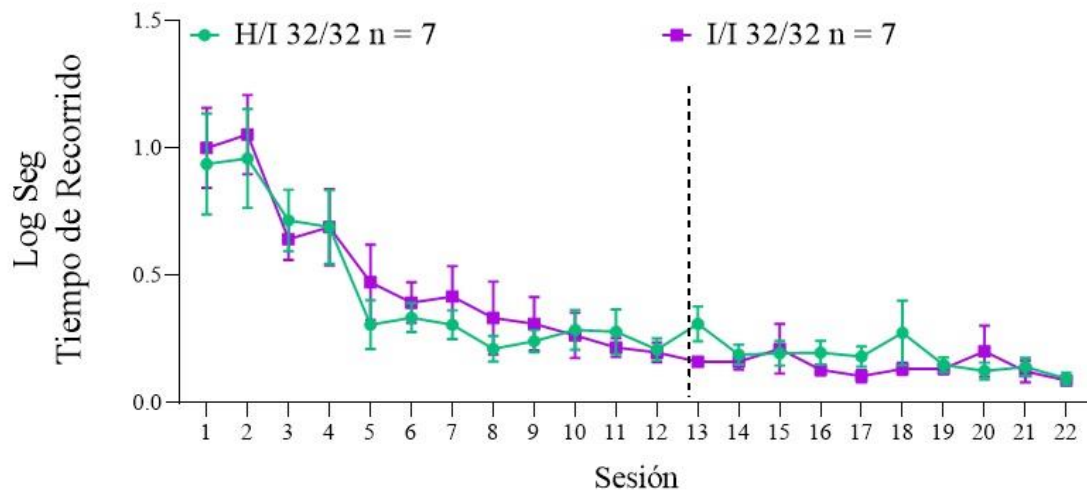


Figura 2.5. Tiempo de recorrido a lo largo de las sesiones (Log s) de los grupos del Experimento 2.
Grupo experimental: Horizontal/Inclinado 32/32. Grupo control: Inclinado/Inclinado 32/32

Discusión

Los resultados obtenidos indican que la inclinación del corredor recto tiene un efecto pequeño sobre los sujetos del grupo Horizontal, que no es detectable si se incluyen en el análisis estadístico todos los ensayos post-cambio. Esta inclinación de 10° no sería lo suficientemente pronunciada como para generar un deterioro significativo en el desempeño. Pero el efecto sorpresivo que representa una tarea ligeramente distinta, sí es capaz de provocar un aumento en el tiempo de recorrido del *runway*. Tal efecto ocurre únicamente en la primera sesión post-cambio. Este tipo de resultado transitorio no podría explicarse en relación a una nueva valuación del incentivo, ya que el efecto debería perdurar más en el tiempo. A su vez, el efecto es muy pequeño como para considerarlo un factor aversivo para los sujetos que provoque un cambio contundente de la conducta.

De esta forma, se puede concluir que el efecto de la pendiente no resulta para los sujetos un factor negativo que pueda generar una respuesta de CNSi, ni tampoco un cambio en el comportamiento que denote un efecto del mayor esfuerzo necesario para obtener la recompensa.

Conclusión General

Los resultados de esta primera serie experimental (Experimentos 1 y 2) mostraron que la pendiente de 10 grados utilizada en el *runway*, no representa para los sujetos del grupo 32/4 Inclinado, un esfuerzo de respuesta que modifique el desempeño

instrumental. Esto puede observarse en el Experimento 2, dado que los sujetos que reciben un refuerzo grande no cambian consistentemente su desempeño luego del aumento de la pendiente del corredor recto. Según la bibliografía, si el efecto de la pendiente fuera significativo e implicara un esfuerzo para los sujetos, se esperaba que las respuestas de los grupos experimentales en el Experimento 1 mostrarían diferencias entre ellos, lo cual no sucedió. Por este motivo, en la próxima serie experimental se decidió mantener el corredor recto siempre en posición horizontal.

Para finalizar, es importante considerar sin embargo que un mayor esfuerzo de respuesta aumenta en algunos casos la valuación de una recompensa (Lydall et al., 2010). Podría entonces argumentarse que la falta de efecto de CNSi en el grupo 32/inclinado se debe a la persistencia de la respuesta luego de una etapa de adquisición en la que los sujetos debían realizar un mayor esfuerzo para obtener la recompensa. Aunque, por otro lado, debido a que tampoco se encontró un efecto de CNSi en el grupo horizontal, es difícil atribuir la falta de efecto en el grupo 32/Inclinado a la inclinación en sí misma. Como se indicó en la introducción de este capítulo, los resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio indican que utilizando 12 sesiones de pre-cambio con un único ensayo diario no se obtiene un efecto de CNSi. Administrando 24 sesiones de pre-cambio distribuidas (también de un ensayo por día), con una recompensa de 32 micropellets (la misma que fue utilizada en los Experimentos 1 y 2 de esta Tesis), sí se logró expresar un efecto de CNSi en el corredor recto (Fernández et al., 2024; ver Exp. 1). Por lo tanto, una alternativa para reproducir el efecto de CNSi sin extender la duración del experimento sería utilizar sesiones masivas de entrenamiento (más de un ensayo por sesión). Otra alternativa al incremento del número de ensayos diarios podría ser aumentar la discrepancia entre el refuerzo grande y pequeño de las fases del experimento. En el siguiente capítulo se exploran estas dos alternativas.

Capítulo 3

Efectos de la distribución de los ensayos y de la discrepancia entre montos de refuerzo en el CNSi

El estudio del fenómeno de Contraste Negativo Sucesivo (CNS) tiene como principales objetivos el entendimiento del valor del incentivo de los refuerzos y el efecto de la devaluación de éstos en la conducta de los sujetos (dado su vínculo con la respuesta de frustración). En el estudio tradicional de Crespi (1942), se evaluó el desempeño de ratas en un corredor recto reforzándolas con distintas magnitudes de refuerzo en las etapas pre y post-cambio (16/4, 16/1 y 16/0); incluyendo además controles sin devaluación (4/4 y 1/1). El autor reportó conductas de frustración (e.g., saltar fuera del aparato experimental, o morder el comedero), y una disminución de la velocidad de recorrido del corredor en los sujetos de los grupos que sufrieron la devaluación de 16 a 4, y de 16 a 1, pero no en aquellos que dejaban de recibir recompensa (es decir, del grupo 16/0). A su vez, se resaltó también que estas conductas se presentaron primero en el grupo 16/1, y posteriormente en el grupo 16/4, más alejadas al evento de devaluación.

Estudios posteriores que replicaron este procedimiento, incluyendo algunas variantes en diversos parámetros, mostraron resultados dispares. Por ejemplo, DiLollo & Beez (1966) entrenaron ratas albinas en un corredor recto con 1, 2, 4, 8, o 16 micropellets de 20 mg durante 20 sesiones de un ensayo por día, que luego fue disminuido a 1 micropellet en 14 sesiones adicionales. Con este programa de entrenamiento, mostraron que el deterioro de la respuesta fue mayor en el grupo que cambió de 16 a 1 micropellet, pero no obtuvieron un efecto típico de CNSi, ya que la curva de desempeño del grupo 16/1 divergía en relación con el control, y nunca recuperaba la respuesta instrumental. En cambio, Binkley et al. (2014) sí mostraron un claro efecto de contraste instrumental en ratas Sprague-Dawley utilizando 12 y 1 pellet como refuerzo grande y pequeño, respectivamente, empleando un entrenamiento masivo (6 sesiones pre-cambio y 6 sesiones post-cambio, con 6 ensayos por día). Por otro lado, Pellegrini & Papini (2007) entrenaron ratas Wistar en un corredor recto en un protocolo de CNSi con diferentes proporciones de recompensas (32/4, 16/4, 32/8, 16/2 y 4/4) durante 24 sesiones pre-cambio y 20 sesiones post-cambio (de un solo ensayo por día). Los resultados indicaron un efecto de CNSi únicamente en la variable de “tiempo de partida” en los grupos 32/4 y 16/2. Otros estudios han empleado soluciones azucaradas como recompensa en un corredor recto (disminuyendo la concentración de sacarosa de 30% a 3%), pero en este caso no se encontró efecto de CNSi (Burns et al., 1978). Globalmente, el análisis

de estos resultados muestra que el efecto de CNSi puede ser esquivo si los parámetros de entrenamiento no son los óptimos.

Como se indicó en el capítulo anterior, en experimentos previos en nuestro laboratorio se había iniciado el estudio de distintas variantes de procedimiento con el objetivo de obtener una respuesta de contraste que fuera robusta y replicable. Animales que recibieron 24 ensayos de pre-cambio reforzadas con 32 pellets en una condición de entrenamiento distribuido (un único ensayo por día), y 4 micropellets en las sesiones post-cambio, mostraron una respuesta de contraste instrumental clara. Por el contrario, la misma discrepancia de recompensas pero con sólo 12 ensayos pre-cambio no había logrado reproducir este efecto (Fernández et al., 2024; Exp. 1).

Analizando los resultados de estos estudios previos, se observa que el efecto de contraste parece depender de distintos factores. En primer lugar, la degradación del incentivo debe ser suficientemente grande. Cuando la discrepancia de los incentivos grande y pequeño está por debajo de un umbral, los animales simplemente ajustan su respuesta al nuevo incentivo, sin mostrar efecto de CNS. Este umbral parece corresponder a una discrepancia de al menos 8 veces entre el incentivo grande y el pequeño (Pellegrini et al., 2008). Teniendo en cuenta esta cuestión, uno de los parámetros de entrenamiento que se estudia en el presente capítulo es la magnitud de recompensa (número de pellets) que recibirán los animales en ambas fases del protocolo. En este sentido, también es importante determinar el monto mínimo de recompensa que permite desarrollar una respuesta consistente de los animales en nuestro aparato instrumental (*runway*). En segundo lugar, para que el efecto de CNS se exprese es necesario que los sujetos hayan generado una expectativa de recibir esa recompensa, de forma que la sustitución del incentivo por uno de menor valor implique una violación de dicha expectativa. Un mayor número de ensayos pre-cambio daría a los individuos una mayor certeza de que las condiciones son estables. Así, manipulando el número de ensayos, sería posible afectar la expectativa de refuerzo grande que tienen los individuos al inicio de la fase post-cambio.

En un protocolo de entrenamiento, los ensayos pueden ser de entrenamiento “masivo” o de entrenamiento “distribuido”. El entrenamiento masivo se refiere a la administración de sesiones con múltiples ensayos diarios separados por intervalos breves, mientras que el entrenamiento distribuido se refiere a programas de entrenamiento con ensayos separados por intervalos prolongados (e.g., un ensayo por día). El CNSi parece requerir un número grande de ensayos pre-cambio, por lo que

el entrenamiento masivo (que permite que los animales reciban más entrenamiento en menos tiempo) podría ser más conveniente. Spear & Spitzner (1967), describieron al fenómeno de CNSi como “frágil, pequeño y difícil de demostrar estadísticamente cuando se trata de ensayos distribuidos”. En experimentos pioneros de Capaldi (1972), utilizando diferentes intervalos inter ensayo (ITI, por sus siglas en inglés), se demostró que es mucho mayor el efecto de contraste en pruebas masivas (en intervalos de 3 a 5 minutos) que en pruebas espaciadas. En consecuencia, lo más tradicional es el uso de entrenamientos masivos, con ITI de 7 minutos (Binkley et al., 2014; Flaherty et al., 1998; Rosas et al., 2007; Sastre et al., 2006), utilizando refuerzos con discrepancia de 10/1 o 12/1 (es decir, 10 o 12 pellets en la etapa pre-cambio y 1 en la etapa post-cambio). Otros efectos relacionados con el efecto de CNS, como el ERPE (Efecto del reforzamiento parcial en la extinción) también se han visto afectados por el uso de entrenamientos masivos o distribuidos. Así, el efecto de ERPE parece ser más claro cuando el entrenamiento es masivo. Este hecho ha sido atribuido al sistema de memoria implicado en uno y otro procedimiento, ya que los entrenamientos masivos se ven más afectados por memoria de corto plazo (Mackintosh, 1974).

Por lo tanto, el objetivo de esta serie experimental, que comprende todo el capítulo, es definir los parámetros suficientes y necesarios para observar un efecto de contraste robusto que se exprese en la variable “tiempo de recorrido”. A partir de la información proveniente de estudios preliminares, sabemos que la reducción de 32 a 4 pellets en una condición de entrenamiento distribuido, luego de 12 ensayos pre-cambio, resulta insuficiente para producir una respuesta de CNSi. Bajo estas condiciones de entrenamiento, podría ocurrir que el umbral de discrepancia se encontrara más alto. De esta manera, considerando esta hipótesis, en el siguiente experimento de esta serie se compararon distintas proporciones de devaluación.

Experimento 3: CNSi en una condición de Ensayos Distribuidos (Entrenamiento distribuido, 12 sesiones de pre-cambio, disparidad 16-8-4-1 pellet)

Como se mencionó anteriormente, en el presente experimento se compararon tres condiciones de devaluación. La proporción correspondiente al nivel de devaluación

típicamente utilizado (8 a 1), una devaluación del doble (16 a 1) y otra de la mitad (4 a 1).

Materiales y métodos

Se utilizaron 42 animales, distribuidos azarosamente en cuatro grupos que difirieron en la cantidad de refuerzo que recibieron en la etapa pre-cambio. De esta forma, se utilizaron tres grupos experimentales que recibieron 16, 8 o 4 micropellets Bioserv en cada sesión de la etapa pre-cambio, y un grupo control que recibió durante todo el entrenamiento 1 micropellet por sesión. En la etapa post-cambio todos los grupos recibieron 1 micropellet como recompensa (*Tabla 3.1*). En este experimento los animales tuvieron, al igual que en el Experimento 1, dos sesiones de pre-entrenamiento (una por día, 15 minutos c/u) para habituar a los sujetos al set experimental. Inmediatamente a estas dos sesiones, se sucedieron 12 sesiones pre-cambio, y posteriormente 10 sesiones post-cambio (1 ensayo de entrenamiento por día).

Tabla 3.1. Diseño experimental pre y post-cambio del Experimento 3.

Grupo	Pre-cambio (12 sesiones)	Post-cambio (10 sesiones)
Experimental 16/1	16 micropellets	1 micropellet
Experimental 8/1	8 micropellets	1 micropellet
Experimental 4/1	4 micropellets	1 micropellet
Control 1/1	1 micropellet	1 micropellet

Resultados

Etapas Pre-Cambio:

Se realizó un ANOVA de medidas repetidas analizando los factores Sesión y Grupo para la variable tiempo de recorrido. No se encontró un efecto de la interacción Sesión x Grupo, pero sí del factor Sesión ($F_{(7,507, 285,3)} = 30.38, p < 0.0001$).

Durante esta etapa pre-cambio se puede observar que el tiempo de recorrido disminuye significativamente a lo largo de las sesiones para todos los grupos, sin que se detecten diferencias entre grupos (*Figura 3.1*). Es decir, que se detectó un cambio

del desempeño en todos los animales, independientemente del monto de refuerzo. Así, este resultado indica que un único pellet es suficiente para producir una mejora en el desempeño en el corredor recto, expresado como una disminución del tiempo de recorrido. Sin embargo, esta conclusión se deriva de la no detección de la interacción Sesión x Grupo. Es decir, que la mejora del desempeño podría haber ocurrido en todos los grupos a excepción del Grupo 1/1, y la falta de detección de interacción habría impedido detectar esta diferencia. Se realizó entonces el análisis de los efectos simples de las sesiones de adquisición únicamente en el Grupo 1/1, para verificar que éste también haya mostrado mejora a lo largo de los ensayos. Se detectaron diferencias entre la primera sesión y las sesiones 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12; a su vez, la sesión 2 difirió de las sesiones 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11 y 12 ($p < 0.05$).

Etapas Post-Cambio:

Se realizó un ANOVA de medidas repetidas y no se encontraron efectos significativos para ninguna de los factores, Sesión ni Grupo ($ps > 0.2$).

A su vez, se calculó el promedio del tiempo de recorrido para cada grupo en cada fase (Tabla 3.2). Los datos de dicha tabla fueron analizados mediante un ANOVA de medidas repetidas Etapa x Grupo. Los resultados indican que no hubo un efecto significativo de la interacción ($p > 0.1$) ni del grupo ($p > 0.5$), pero sí del factor “Etapa” ($F_{(1,38)} = 23.39$, $p < 0.0001$). El análisis post hoc mostró diferencias significativas entre etapas en el Grupo 4/1 ($p < 0.0001$).

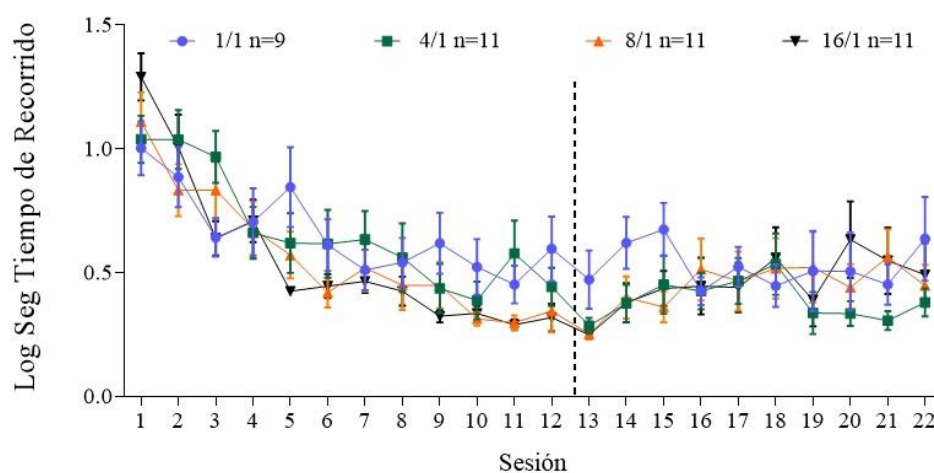


Figura 3.1. Tiempo de recorrido (Log s) para todos los grupos, a lo largo de las sesiones de Pre-cambio y Post-cambio del Experimento 3. Grupos experimentales: 16/1, 8/1, 4/1. Grupo control 1/1. La línea punteada refiere al cambio de la recompensa en los grupos experimentales.

Tabla 3.2. Tiempo de recorrido promedio (Log s) de todos los grupos en ambas etapas (pre y post-cambio) del Experimento 3.

Tiempo de Recorrido (Log s)				
Grupo	Promedio Pre-cambio	SEM	Promedio Post-cambio	SEM
16/1 (n=11)	0.35	0.02	0.45	0.03
8/1 (n=11)	0.39	0.03	0.44	0.10
4/1 (n=11)	0.50	0.03	0.38	0.02
1/1 (n=9)	0.53	0.02	0.52	0.02

Discusión

En la *Figura 3.1* se presentan el tiempo de recorrido de todos los grupos. Los resultados muestran que no hay un efecto de Contraste Negativo Sucesivo en ninguno de los grupos devaluados. Al mismo tiempo, se puede observar que el grupo control muestra un pobre desempeño general, teniendo un tiempo de recorrido más alto que los experimentales. A su vez, en la etapa post-cambio, el desempeño de los grupos experimentales muestra un leve aumento de los tiempos de recorrido, pero no logran superar y diferenciarse de los valores del grupo control (que a su vez es algo inestable).

En la *Tabla 3.1* se observan los tiempos de recorrido promedio por etapa (pre y post-cambio), comparando la media del desempeño general de cada grupo antes y después de la devaluación. El análisis estadístico detectó un aumento del tiempo de recorrido entre etapas, pero no mostró diferencias entre los grupos ni interacción. Más aún, se observa que en ningún caso el promedio de los grupos experimentales superó nominalmente al promedio de respuesta del grupo control. Por lo tanto, los resultados indican que no se halló un efecto de CNSi utilizando estos parámetros.

Cuando se observa el tiempo de recorrido del Grupo control 1/1 en este experimento, es importante destacar que los sujetos muestran un desempeño con alta dispersión. Existen animales dentro de este grupo que presentaron tiempos de respuesta muy altos a lo largo de todo el entrenamiento. Pero al mismo tiempo también se observa una curva de aprendizaje en este Grupo 1/1, con una disminución relativa del tiempo de recorrido a lo largo de las sesiones. Sin embargo, esta cantidad mínima de recompensa recibida (1 pellet), en relación a la energía que se necesita para obtenerla, parecería ser insuficiente para generar una motivación homogénea en

todos los sujetos de este grupo. Por otro lado, en la fase post-cambio, los animales de los grupos experimentales muestran una modificación relativamente leve de su desempeño, aún en el caso de pasar de un monto grande (16 pellets) a la cantidad mínima (1 pellet).

Por lo tanto, este protocolo no mejoró los resultados de los estudios previos que utilizaron la proporción 32/4, a pesar de haber duplicado la discrepancia en la devaluación de la recompensa. Así, la condición de ensayos distribuidos, con estos niveles de discrepancia, parece no ser suficiente como para generar una expectativa de incentivo de alto valor que logre diferenciar las respuestas entre grupos en la etapa pre-cambio, y que al mismo tiempo evoque la aparición de emociones negativas y la respuesta de frustración en la etapa post-cambio. De esta manera, los resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio (Fernández et al., 2024; Exp. 1), sumados a los registrados en esta primera parte del trabajo de Tesis, indican que el entrenamiento mediante ensayos distribuidos parece requerir de un número grande de ensayos pre-cambio (al menos 24). Ni el aumento del esfuerzo de respuesta (Experimento 1), ni el aumento de la discrepancia (Experimento 3) fueron efectivos para detectar CNSi en estas condiciones.

Una serie de estudios previos demuestran que en algunas tareas existe una diferenciación en el desempeño de los individuos cuando se emplean entrenamientos de práctica masiva o distribuida. Por ejemplo, se ha encontrado que las ratas se desempeñan mejor en tareas espaciales (como el laberinto en forma de cruz o tareas espaciales con claves visuales) cuando los entrenamientos son masivos (e.g., Honey, 1996; Thompson & Thompson, 1949). En otro trabajo, Wingard et al. (2015) compararon el entrenamiento masivo y el distribuido en una tarea espacial. Utilizaron un laberinto de Morris acuático que tenía inmerso un laberinto en cruz. Los animales debían encontrar una plataforma utilizando claves visuales. Observaron un mejor desempeño de las ratas entrenadas mediante ensayos masivos. Por otro lado, estos mismos autores mostraron que el entrenamiento distribuido llevaba a un mejor desempeño cuando debían orientarse en el espacio sin utilizar claves visuales (es decir, los sujetos debían recordar el brazo visitado previamente para dirigirse al brazo inmediatamente a su derecha para encontrar la plataforma). A partir de esta evidencia, se desprende entonces que existen distintos tipos de mecanismos que promueven estos tipos de aprendizaje, y que están regulados de manera distinta por la experiencia en la tarea y la memoria.

A su vez, muchos autores acentúan la existencia de múltiples sistemas de memoria, que se diversifican en su función y en su anatomía. Una de las áreas *target* vinculada a las tareas espaciales utilizando claves visuales es el hipocampo, que además se sabe que participa en la formación de memorias cognitivas inmediatas (e.g., Packard & McGaugh, 1996). Se puede especular que el entrenamiento distribuido beneficia selectivamente el aprendizaje en tareas que no requieren memoria cognitiva dependiente del hipocampo, mientras que una distribución masiva de ensayos puede beneficiar selectivamente el aprendizaje dependiente del hipocampo (Packard et al., 2013). En este sentido, los estudios de lesión muestran que el CNS instrumental necesita de un hipocampo intacto, mientras que el CNS consumatorio ocurre aún en animales con lesión hipocampal (Flaherty et al., 1998).

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, resulta interesante explorar el efecto del entrenamiento masivo en un paradigma de CNSi, cuestión que será abordada en los siguientes experimentos. Por otro lado, también se decidió analizar si era posible mejorar la estabilidad del desempeño del grupo control aumentando la recompensa total que los sujetos recibían en una sesión de entrenamiento.

En los Experimentos 4 y 5 se utilizarán entonces las mismas proporciones de recompensa utilizadas en el Experimento 3 (16/1, 8/1, 4/1, 1/1). En este caso, los sujetos serán entrenados bajo protocolos de práctica masiva (4 ensayos por día), donde así se variará la experiencia diaria que los sujetos tienen con la recompensa. De esta manera, se espera tener una mejor comprensión del valor de la expectativa y del valor relativo del refuerzo, ya que los animales sufrirán una degradación de la recompensa de la misma proporción que en el Experimento 3, pero con una dinámica distinta de entrenamiento que proporciona una mayor experiencia diaria.

Experimento 4: Ensayos Masivos con 3 sesiones pre-cambio y 6 post-cambio (Entrenamiento masivo, 3 sesiones de pre-cambio, disparidad 16-8-4-1 pellet)

A fin de comenzar el estudio del efecto del entrenamiento masivo en un paradigma de CNSi, en el Experimento 4 se propuso un protocolo de adquisición de 3 sesiones con ensayos masivos (4 ensayos por sesión), que representan la misma cantidad total de ensayos pre-cambio que fueron utilizadas en los Experimentos 1, 2 y 3 de esta Tesis (12 ensayos).

Materiales y métodos

Se utilizaron 29 animales distribuidos azarosamente en 4 grupos experimentales que recibían la misma recompensa que los sujetos del Experimento 3. En este caso, las sesiones estaban compuestas por 4 ensayos consecutivos, y cada sujeto recibió una sesión diaria. De esta forma, los animales recibieron la recompensa asignada cuatro veces por sesión. A esta modalidad de entrenamiento la denominaremos “Entrenamiento Masivo” (en contraposición al “Entrenamiento Distribuido”, en el que los sujetos son expuestos sólo una única vez por sesión a la práctica experimental; e.g., una vez cada 24 horas).

En este experimento, los animales fueron expuestos a 2 sesiones de pre-entrenamiento (15 minutos cada una, ídem al Experimento 1). Luego, como se mencionó previamente, se administraron sesiones de 4 ensayos (ITI 30 seg) cada una: 3 de pre-cambio (12 ensayos totales) y 6 de post-cambio (24 ensayos totales) (Tabla 3.3). Se administraron más sesiones de post-cambio para tener una mayor ventana temporal de registro.

Tabla 3.3. Diseño experimental pre y post-cambio del Experimento 4.

Grupo	Pre-cambio (3 sesiones; Post-cambio (6 sesiones;	
	4 ensayos c/u)	4 ensayos c/u)
Experimental 16/1	16 micropellets	1 micropellet
Experimental 8/1	8 micropellets	1 micropellet
Experimental 4/1	4 micropellets	1 micropellet
Control 1/1	1 micropellet	1 micropellet

Resultados

Etapas pre-cambio:

En la *Figura 3.2* se observa el tiempo de recorrido de todos los grupos a lo largo de las sesiones. Se decidió graficar y analizar el promedio del tiempo en sesiones (que incluyen los 4 ensayos diarios), para hacer más simple la visualización de los resultados.

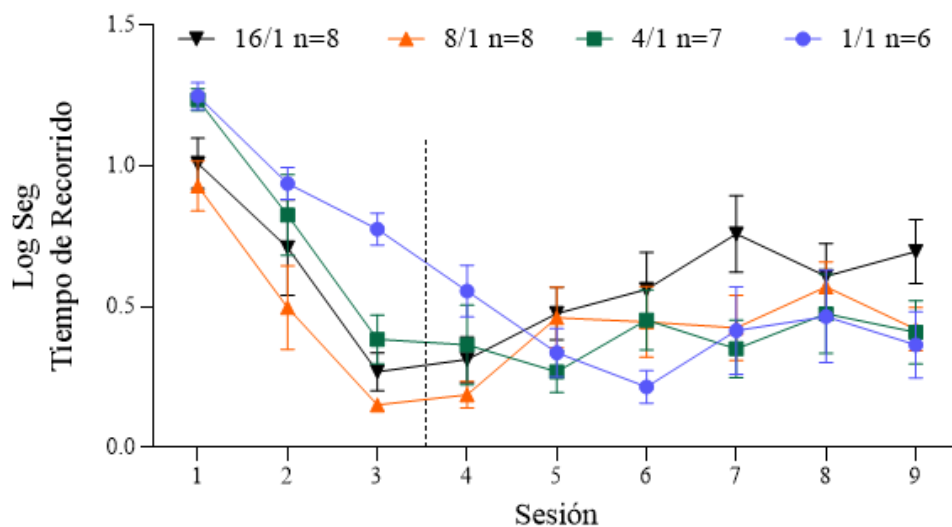


Figura 3.2. Tiempo de recorrido (Log s) para todos los grupos, a lo largo de las sesiones del Experimento 4. Grupos experimentales: 16/1, 8/1, 4/1. Grupo control 1/1. La línea punteada refiere al cambio de la recompensa en los grupos experimentales.

Se realizó un ANOVA de medidas repetidas para la variable Tiempo de Recorrido indicó un efecto significativo del factor Sesión ($F_{(1,667, 41,68)} = 62.73$, $p < 0.0001$) y del factor Grupo ($F_{(3, 25)} = 7.854$, $p = 0.0007$). Posteriormente se realizó el test de LSD Fisher de comparaciones múltiples y se obtuvieron diferencias significativas entre el Grupo Control 1/1 y los Grupos 8/1 y 16/1 para la primera sesión, entre el Grupo Control y el Grupo 8/1 en la segunda sesión, y entre el Grupo Control y todos los grupos experimentales en la sesión 3 ($p < 0.05$).

Etapas post-cambio:

Se realizó un ANOVA de medidas repetidas para el Tiempo de Recorrido para los factores Sesión y Grupo, y no se encontraron efectos significativos de la interacción ni de ninguno de los factores individualmente ($ps > 0.05$).

Asimismo, se hizo una tabla comparativa (Tabla 3.4) para visualizar el tiempo de recorrido promedio de cada grupo. Para el caso del pre-cambio, se utilizaron los últimos 4 ensayos, mientras que para el post-cambio se promediaron todos los ensayos. Se analizaron estos promedios con un ANOVA de medidas repetidas, que mostró un efecto significativo de la interacción Etapa x Grupo ($F_{(3, 25)} = 11.25$, $p < 0.0001$) y de Grupo ($F_{(3, 25)} = 4.652$, $p < 0.02$). El análisis post-hoc mostró diferencias significativas entre el control y todos los grupos experimentales en la etapa pre-

cambio ($p < 0.001$), y no se detectaron diferencias significativas entre los grupos en la etapa post-cambio ($ps > 0.05$).

Tabla 3.4. Tiempo de recorrido promedio (Log s) de todos los grupos en ambas etapas.

Tiempo de Recorrido (Log s)				
Grupo	Promedio Pre-cambio	SEM	Promedio Post-cambio	SEM
16/1 (n=6)	0.25	0.06	0.67	0.47
8/1 (n=7)	0.14	0.02	0.30	0.10
4/1 (n=8)	0.33	0.09	0.29	0.11
1/1 (n=8)	0.75	0.05	0.49	0.04

Experimento 5: Ensayos Masivos 6 sesiones pre-cambio y 6 post-cambio (Entrenamiento masivo, 6 sesiones de pre-cambio, disparidad 16-8-4-1 pellet)

En este experimento se administrarán 6 sesiones diarias de adquisición (cada una de 4 ensayos). Es decir, un total de 24 ensayos (que en condiciones de entrenamiento distribuido fueron suficientes para obtener un efecto de CNSi robusto; Fernández et al., 2024).

Materiales y métodos

Se usaron 49 animales distribuidos en 4 grupos experimentales que recibían la misma recompensa que en el Experimento 3 y 4. Fueron expuestos a la misma condición de ensayos masivos que se utilizó en el Experimento 4. También recibieron 2 sesiones de pre-entrenamiento (15 min c/u), y luego 6 sesiones pre-cambio y 6 sesiones post-cambio (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Diseño Experimental de pre y post-cambio del Experimento 5.

Grupo	Pre-cambio (6 sesiones; 4 ensayos c/u)	Post-cambio (6 sesiones; 4 ensayos c/u)
Experimental 16/1	16 micropellets	1 micropellet
Experimental 8/1	8 micropellets	1 micropellet
Experimental 4/1	4 micropellets	1 micropellet
Control 1/1	1 micropellet	1 micropellet

Resultados

Etapla pre-cambio:

En la *Figura 3.3* se grafica el tiempo de recorrido de todos los grupos, a lo largo de las sesiones (se promediaron los 4 ensayos por sesión). Se realizó un ANOVA de medidas repetidas para detectar la importancia de los factores Grupo y Sesión. El análisis indicó un efecto significativo de interacción Sesión x Grupo ($F_{(15, 240)} = 1.887, p < 0.0251$); además, un efecto significativo de Sesión ($F_{(3,393, 162,9)} = 83.68, p < 0.0001$) y un efecto significativo de Grupo ($F_{(3, 48)} = 6.002, p < 0.0015$). Las comparaciones post hoc mostraron diferencias significativas entre los Grupos 16/1 y 4/1 en la sesión 1 ($p < 0.04$), entre el 16/1 y el 1/1 en la sesión 2, 3, 4, 5 y 6 ($ps < 0.04$), entre el Grupo 8/1 y el 1/1 en la sesión 5 ($p < 0.043$), y entre el 4/1 y el 1/1 en la sesión 4 ($p < 0.003$).

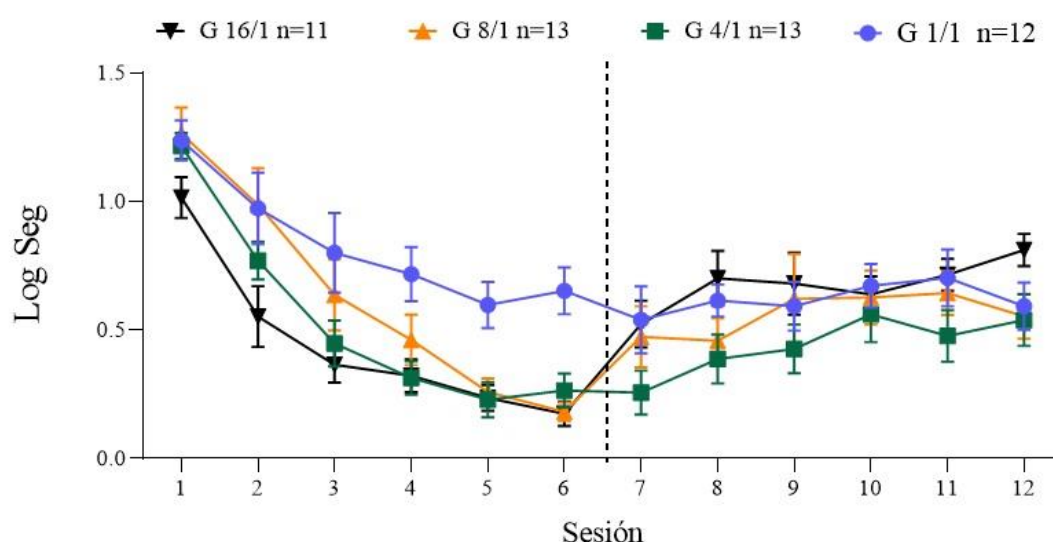


Figura 3.3. Tiempo de recorrido (Log s) para todos los grupos, a lo largo de las sesiones del Experimento 5. Grupos experimentales: 16/1, 8/1, 4/1. Grupo control: 1/1. La línea punteada refiere al cambio de la recompensa en los grupos experimentales.

Etapla Post-cambio:

Un ANOVA de medidas repetidas indicó un efecto significativo solamente en la variable Sesión ($F_{(4,133, 198,4)} = 2.797, p < 0.03$). Los demás factores no mostraron efectos significativos ($ps > 0.05$). El análisis de LSD Fisher indicó diferencias significativas entre la sesión 7 y la 12 para el grupo 16/1 ($p < 0.01$).

A su vez, se realizó una tabla (*Tabla 3.6*) donde se describieron las medias del desempeño en cada etapa, junto con sus SEM. Para el caso de la etapa pre-cambio,

se tomaron en cuenta las últimas 4 sesiones, y para el post-cambio se tuvieron en cuenta todas las sesiones. Un ANOVA de medidas repetidas indicó un efecto significativo de la interacción Etapa x Grupo ($F_{(3, 48)} = 6.942, p < 0.001$), un efecto significativo del Grupo ($F_{(3, 48)} = 4.235, p < 0.001$) y de Etapa ($F_{(1,48)} = 14.54, p < 0.004$). El análisis post-hoc mostró diferencias significativas entre el grupos control y todos los experimentales en la etapa pre-cambio ($ps < 0.005$). Para la etapa post-cambio se encontraron diferencias significativas entre el Grupo 4/1 y el 16/1 ($p < 0.03$).

Tabla 3.6. Tiempo de recorrido promedio (Log s) de todos los grupos en ambas etapas.

Tiempo de Recorrido (Log s)				
Grupo	Promedio Pre-cambio	SEM	Promedio Post-cambio	SEM
16/1 (n=11)	0.31	0.05	0.75	0.03
8/1 (n=13)	0.39	0.10	0.65	0.04
4/1 (n=13)	0.40	0.05	0.58	0.04
1/1 (n=12)	0.77	0.03	0.69	0.04

Discusión

Las Figuras 3.2 y 3.3 (Experimentos 4 y 5) mostraron que bajo estas condiciones no se obtiene un efecto de contraste. En ambos casos, en la etapa pre-cambio se observan diferencias entre los grupos experimentales y el control. Por otro lado, en la etapa post-cambio también se observa que los animales ajustan su nivel de respuesta al nuevo incentivo y desaparecen las diferencias entre grupos. Si bien, hay una tendencia en los valores promedios que parece indicar que los animales de los grupos 16/1 tienen un aumento del tiempo de recorrido en la etapa post-cambio, los test estadísticos no detectan este efecto (de este modo, en estas condiciones parece no haber diferencias entre grupos luego de la devaluación). Estos resultados, contrariamente a lo esperado, son concordantes con la *Ley del Efecto* postulada por Thorndike (1898), que propone que el desempeño que puede alcanzar un sujeto es directamente proporcional a la magnitud del reforzador, y que el ajuste comportamental ante cambios en la recompensa debería darse de manera paulatina

(contrariamente a lo observado en los efectos paradójicos, que no siguen una regla lineal).

En ambos experimentos se aumentó la discrepancia entre etapas, duplicando la diferencia de 8/1 que ha sido postulada como la mínima necesaria para observar efecto de contraste (Papini & Pellegrini, 2006). Adicionalmente, en el Experimento 5 se duplicó el número de ensayos pre-cambio (con respecto al Experimento 4), aumentando la experiencia con el refuerzo grande previo a la devaluación. Aun así, estas condiciones parecen no ser suficientes para que se exprese el fenómeno de CNSi.

Al comparar los experimentos que utilizaron un número de ensayos y montos de recompensa similares, pero en condiciones de entrenamiento masivo versus distribuido, es posible notar ciertas diferencias. En primer lugar, el efecto de la magnitud del refuerzo en la fase pre-cambio ha sido detectado en los Experimentos 4 y 5, pero no en el Experimento 3. Este resultado es notable, ya que los animales en el Experimento 4 tuvieron el mismo número de ensayos que los sujetos del Experimento 3 (es decir, en ambos experimentos los sujetos recibieron la recompensa 12 veces antes del cambio). Por lo tanto, esto sugiere que la diferencia está en la dinámica de entrenamiento.

Tal como se indicó anteriormente, en nuestro laboratorio ya habíamos logrado demostrar un efecto de CNSi por medio de un entrenamiento distribuido, empleando 24 ensayos pre-cambio (Fernández et al., 2024; Exp. 1). Por otro lado, los resultados presentados hasta aquí en esta Tesis sugieren que el uso de un entrenamiento masivo podría ser una estrategia plausible para tratar de reducir el número de días de entrenamiento requeridos para reproducir de forma consistente este fenómeno.

Tomando en cuenta las observaciones anteriores respecto de los montos de refuerzo, observamos que el nivel de desempeño del grupo Control en los Experimentos 4 y 5 fue inestable a lo largo del tiempo (tal vez, esto pueda ser asignado a que el valor de incentivo de un micropellet no es suficiente para generar un nivel de respuesta sostenido). Por lo tanto, en el siguiente experimento se utilizó como recompensa para el grupo control 2 micropellets (en lugar de uno), intentando obtener así una respuesta más robusta y consistente. Además, como recompensa del grupo experimental se propuso utilizar 16 micropellets, para mantener la relación 8:1. Recordemos que esta discrepancia es reconocida como la mínima requerida para observar un efecto de contraste en un paradigma consumatorio (Papini & Pellegrini,

2006). La explicación de dicha proporción está en relación a la *Ley de Webber*, que establece que la diferencia perceptible más pequeña en un estímulo, es proporcional al valor del estímulo inicial. Esto significa que la capacidad de detectar un cambio en un estímulo depende de la proporción del cambio respecto al estímulo original. En el estudio de Papini & Pellegrini (2006), se aplicaron distintas discrepancias entre la etapa pre y post-cambio, y se obtuvo un mayor efecto cuando se devaluaron las soluciones de sacarosa de 32% a 4% y de 16% a 2%. Como se mencionó anteriormente, el fenómeno de CNS resulta fundamental para entender el valor relativo que se le asigna a un refuerzo y, por lo tanto, el estudio de la mínima discrepancia necesaria para obtener un efecto es imprescindible para lograr consistencia en los protocolos.

Resumiendo, considerando la evidencia previa y la manipulación de la magnitud de la recompensa y la experiencia (cantidad de práctica) realizada hasta el momento en la presente Tesis, en el Experimento 6 se planteó mantener la proporción 8:1 entre etapas, pero aumentando la magnitud del refuerzo más pequeño a 2 micropellets (discrepancia 16/2) y aumentando el número de sesiones pre-cambio (de 6 a 12).

Experimento 6: Ensayos Masivos 12 Sesiones pre-cambio y 8 post-cambio (Entrenamiento masivo, 12 sesiones de pre-cambio, disparidad 16-2 pellets)

Como ya se mencionó, un problema potencial con la pequeña magnitud de recompensa utilizada en el grupo Control de los experimentos anteriores (un pellet), es que puede no ser incentivo suficiente para permitir que emerja el efecto de CNSi. Si efectivamente el desempeño de los controles con una pequeña cantidad de comida es tan bajo y poco consistente, existe la posibilidad de que el efecto de la devaluación en el grupo experimental no se llegue a diferenciar por debajo del grupo control ya que el desempeño de ambos es muy bajo. De hecho, en el Experimento 5 hubo cierta evidencia de un efecto emergente en el Grupo 16/1 durante la última sesión post-cambio, lo que podría sugerir un inicio demorado del fenómeno (ver *Figura 3.3*). Así, con el fin de aumentar las diferencias entre grupos en la etapa post-cambio, en el Experimento 6 se utilizó el mismo procedimiento anterior, pero (1) duplicando el número de ensayos pre-cambio, y (2) realizando una devaluación de 16 a 2 pellets.

Materiales y métodos

Fueron utilizados 15 animales, que recibieron 2 sesiones de pre-entrenamiento (15 min c/u), como en los casos anteriores. Luego fueron sometidos a 12 sesiones diarias de pre-cambio y 8 sesiones diarias de post-cambio. Cada sesión constaba de 4 ensayos separados por un intervalo de 30 segundos. Para los Grupos 16/2 ($n = 7$) y 2/2 ($n = 8$), cada ensayo de pre-cambio terminó con 16 o 2 pellets, respectivamente. Por lo tanto, los Grupos 16/2 y 2/2 recibieron un total de 64 o 8 pellets por sesión, respectivamente. Cada ensayo de post-cambio terminó con 2 pellets para todos los animales.

Al final de cada sesión, el suelo del aparato fue limpiado con un paño húmedo impregnado en una solución al 70% de etanol. Todas las demás condiciones y análisis estadísticos fueron llevados a cabo según lo descrito en el Experimento 1.

Tabla 3.7. Diseño Experimental de pre y post-cambio del Experimento 6.

Grupo	Pre-cambio (12 sesiones; 4 ensayos c/u)	Post-cambio (6 sesiones; 4 ensayos c/u)
Experimental 16/2	16 micropellets	2 micropellets
Control 2/2	2 micropellets	2 micropellets

Resultados

Etapas Pre-cambio:

En la *Figura 3.4* se observa el tiempo de recorrido de los grupos expresado en logaritmo de segundos, a través de las sesiones. Un ANOVA de medidas repetidas mostró un efecto significativo de la variable sesión ($F_{(4,488, 58,34)} = 30.17, p < 0.0001$) y un efecto del grupo ($F_{(1, 13)} = 10.83, p < 0.0058$).

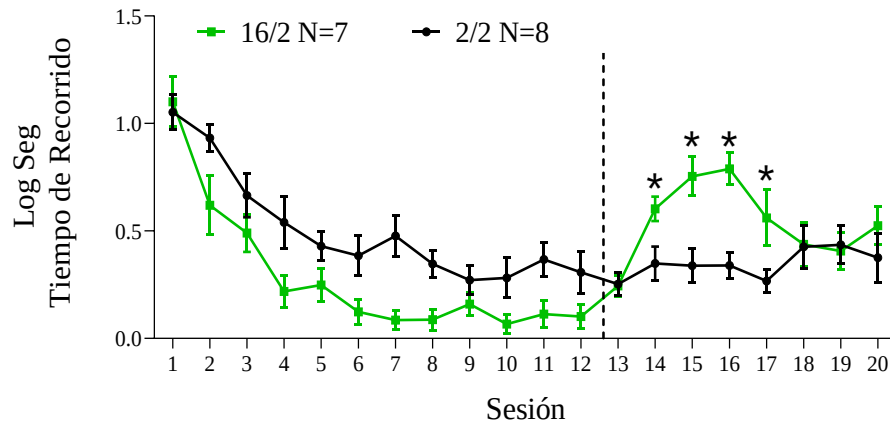


Figura 3.4. Tiempo de recorrido (Log s) para todos los grupos del Experimento 6, a lo largo de las sesiones. Grupo experimental: 16/2. Grupo control 2/2. La línea punteada refiere al cambio de la recompensa en el grupo experimental.

Etapas Post-cambio:

Aplicado al período de post-cambio, el ANOVA arrojó un efecto significativo de la interacción Sesión x Grupo ($F_{(7,91)} = 3.400, p < 0.0029$), de Sesión ($F_{(4,786, 62,22)} = 3,528, p < 0.0079$) y de Grupo ($F_{(1,13)} = 7.348, p < 0.0178$). Por otro lado, un análisis post hoc con LSD Fisher indicó diferencias significativas entre los grupos en las sesiones 14, 15, 16 y 17 ($ps < 0.05$).

A su vez, en la *Tabla 3.4* se expresaron los tiempos promedio de recorrido de los grupos en cada etapa. Para el caso del pre-cambio se tomaron en cuenta todas las sesiones excluyendo la 1 y la 2. Para el caso del post-cambio se tomaron en cuenta todas las sesiones. Se realizó un ANOVA de medidas repetidas analizando la relevancia de los factores Etapa y Grupo. El análisis arrojó un efecto significativo de la interacción Etapa x Grupo ($F_{(1, 13)} = 26.09, p < 0.001$) y del factor Etapa ($F_{(1, 13)} = 14.16, p < 0.002$). En análisis post-hoc mostró diferencias significativas entre etapas para el grupo 16/2 ($p < 0.0001$).

Tabla 3.7. Tiempo de recorrido promedio (Log s) de todos los grupos en ambas etapas.

Tiempo de Recorrido m(Log s)				
Grupo	Promedio Pre-cambio	SEM	Promedio Post-cambio	SEM
16/2 (n=7)	0.22	0.04	0.61	0.06
2/2 (n=8)	0.51	0.04	0.40	0.03

Por otro lado, en la *Figura 3.5* se grafica el desempeño de los grupos en cada ensayo por separado (desde el ensayo 1 al ensayo 4). Es decir, que para cada sesión se analizó un único ensayo, según el orden correspondiente. Para esto, se realizaron ANOVAs de medidas repetidas para cada ensayo, analizando como factores principales el Grupo y la Sesión (de la misma forma que se analizaron los promedios por sesión).

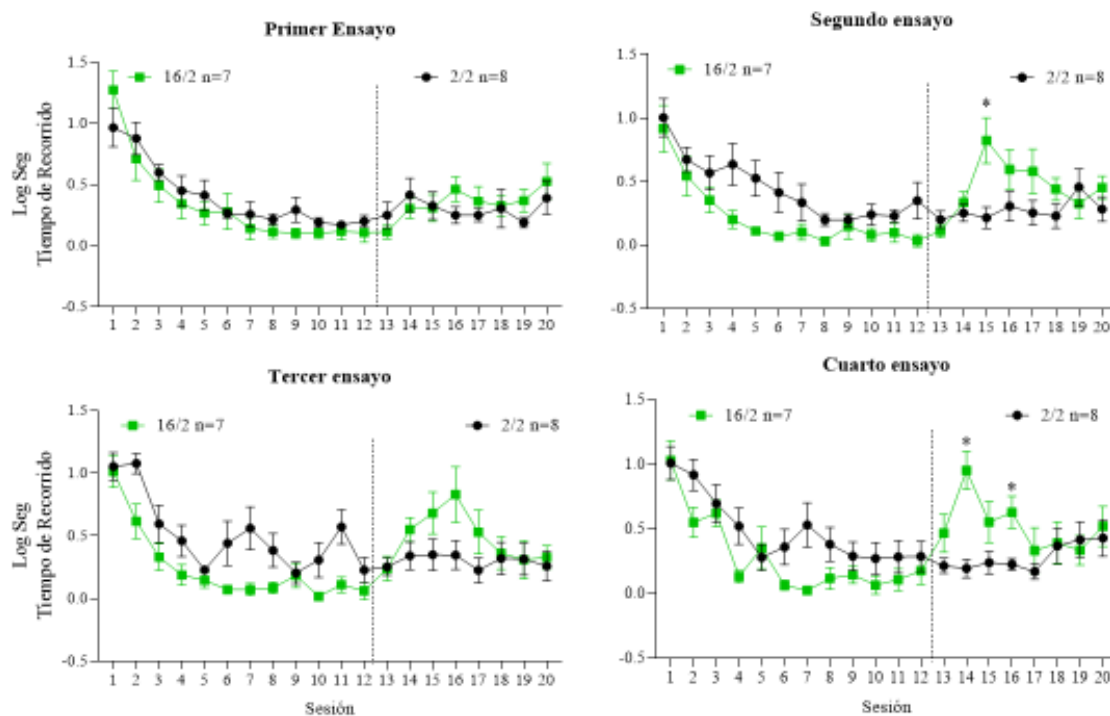


Figura 3.5. Tiempo de Recorrido (Log s) discriminado por ensayos. En cada gráfico se observa el tiempo de recorrido promedio de cada grupo en cada uno de los ensayos por separado.

Primer ensayo: para el caso del ensayo 1, se encontraron efectos significativos de Sesión ($F_{(3,589, 46,66)} = 31.46, p < 0.0001$) en la etapa pre-cambio. En la etapa post-cambio no se encontraron efectos significativos de ningún factor ($p > 0.5$).

Segundo ensayo: en la etapa pre-cambio, en análisis arrojó un efecto significativo de Sesión ($F_{(4,736, 61,57)} = 11.88, p < 0.0001$) y grupo ($F_{(1, 13)} = 9.244, p < 0.0095$). Para la etapa post-cambio, los resultados arrojaron un efecto significativo de la interacción Sesión x Grupo ($F_{(7, 91)} = 2.693, p < 0.0139$) y del Grupo ($F_{(1, 13)} = 5.324, p < 0.0381$). El análisis post-hoc mostró diferencias significativas entre grupos para la sesión 15 ($p < 0.0137$).

Tercer ensayo: para la etapa pre-cambio, el análisis arrojó un efecto significativo de Sesión ($F_{(5,850, 76,04)} = 14.46, p < 0.0001$) y Grupo ($F_{(1, 13)} = 17.73, p = 0.0010$). Para la etapa post-cambio, se encontró un efecto significativo del factor grupo ($F_{(1, 13)} = 4.878, p < 0.0458$).

Cuarto ensayo: en la etapa pre-cambio, se encontraron efectos significativos de Sesión ($F_{(5,572, 72,44)} = 12.23, p < 0.0001$) y de Grupo ($F_{(1, 13)} = 7.093, p = 0.0195$). Para la etapa post-cambio se encontraron efectos significativos de la interacción Sesión x Grupo ($F_{(7, 91)} = 2.600, p < 0.0172$) y de Grupo ($F_{(1, 13)} = 7.582, p < 0.0164$). El análisis de LSD Fisher mostró diferencias significativas entre grupos para las sesiones 14 ($p < 0.0014$) y 16 ($p < 0.0169$).

Discusión

Los resultados obtenidos utilizando un entrenamiento masivo (4 ensayos por sesión diaria), 12 sesiones de pre-cambio y una disparidad 16/2 pellets, indican que se logra expresar un efecto de CNSi robusto. Así, es posible observar un empeoramiento del desempeño del grupo experimental luego de la devaluación, en comparación con el grupo control, y un período posterior de recuperación de la respuesta característica del fenómeno.

Es interesante resaltar cómo es la dinámica del desempeño intra-sesión (*Figura 3.5*). En primer lugar, se observa que en los primeros ensayos de cada sesión los sujetos del grupo experimental y control no difieren en la conducta. Esto sugiere que ambos grupos están motivados para obtener el refuerzo (lo que confirma que el aumento de la cantidad de pellets recibidos por el grupo control promovió un desempeño consistente a lo largo del entrenamiento). A su vez, en el primer ensayo de cada sesión post-cambio, el grupo experimental mantiene la respuesta instrumental adquirida en la fase pre-cambio. El efecto de CNSi se observa en los ensayos subsiguientes, en los cuales se detecta un aumento del tiempo de recorrido. Este efecto, según la teoría, se debe a un proceso emocional de alejamiento del espacio donde fue devaluada la recompensa (que representa un espacio asociado a un evento aversivo). Hacia las últimas sesiones, el desempeño intra-sesión de los sujetos experimentales tienden a asemejarse al de los controles. Tal como se describió previamente en el Capítulo 1, el efecto de CNSi se produce de manera anticipatoria; es decir, en los ensayos posteriores a la devaluación, los sujetos comienzan a cambiar de estrategia comportamental para alejarse del lugar donde

ocurrió el evento aversivo. De esta forma, en el primer ensayo post-cambio (sesión 13) no se observa disminución del desempeño, mientras que el efecto de la devaluación sí se observa en los siguientes ensayos de esa misma sesión (*Figura 3.5*). Este patrón de comportamiento se ha explicado en relación al fenómeno denominado *sensory carry over* (persistencia sensorial). Este fenómeno se refiere a la posibilidad de que un breve intervalo entre ensayos pueda permitir que los efectos secundarios de un ensayo (e.g., efectos secundarios sensoriales o de memoria a corto plazo) controlen el comportamiento en el ensayo posterior (Hull, 1952; Sheffield, 1949).

Finalmente, es importante destacar que en este experimento se conservó la discrepancia 8:1, estudiada previamente en fenómenos de CNSc (Papini & Pellegrini 2006). A su vez, se mantuvieron los 12 días de entrenamiento utilizados en los experimentos de entrenamiento distribuido, donde no se había logrado expresar un efecto de contraste (por ejemplo, Experimentos 1, 2 y 3 de esta Tesis, y Exp. 1 de Fernández et al., 2024). Al mismo tiempo, se duplicó la cantidad de sesiones de entrenamiento pre-cambio respecto al Experimento 5 de esta Tesis, y se cuadruplicó con respecto al Experimento 4. Bajo estas condiciones de discrepancia y experiencia, el efecto de CNSi es robusto, observándose diferencias significativas entre los grupos en la etapa post-cambio. Esto sugiere que el fenómeno de CNSi, además de una discrepancia mínima en los refuerzos, también necesita de una experiencia previa mínima con la recompensa y el contexto que permita generar una expectativa certera para el animal. Esta expectativa parece formarse más fuertemente en protocolos de ensayos masivos que distribuidos, lo que provoca que el efecto negativo de la devaluación repercuta visiblemente en la conducta. Por lo tanto, utilizando estas condiciones en nuestro modelo experimental en ratas Long Evans, obtuvimos un protocolo robusto que nos permitirá continuar con el análisis de variables comportamentales relacionadas con el efecto emocional negativo de la devaluación de la recompensa, así como también el estudio de las bases neurales del fenómeno.

Experimento 7: CNSi y Registros comportamentales en la caja meta

En todos los experimentos presentados hasta aquí, se evaluó la frustración midiendo únicamente el desempeño a través del tiempo de recorrido en una tarea instrumental. Dado que el efecto de CNS se explica como una respuesta emocional frente a la

devaluación sorpresiva de una recompensa, otras conductas observables podrían estar también afectadas después de este cambio inesperado. Por lo tanto, en este experimento se registró mediante una videocámara la conducta de los animales en el compartimiento meta durante los dos minutos que disponen para consumir el refuerzo (tiempo de reforzamiento). Las conductas que se registraron están relacionadas a respuestas de estrés y ansiedad: la locomoción y el *rearing* (o exploración vertical). A su vez, se analizó también la cantidad de veces que los sujetos metían la cabeza en el comedero. Así, en este último experimento del capítulo se trató de describir la expresión emocional del efecto de CNSi. Para esto, se compararon grupos experimentales y controles que ejecutaban la respuesta instrumental en el corredor recto para obtener la recompensa (usando los mismos parámetros que en el Experimento 6), con animales que recibían la misma dinámica de reforzamiento, pero directamente en la caja meta (sin recorrer el corredor recto). Debido a que las teorías del aprendizaje predicen que la valuación del incentivo se modifica en relación al esfuerzo necesario para obtenerlo, se espera visualizar en las variables conductuales antes citadas una diferencia entre aquellos sujetos que debían realizar una respuesta para obtener un refuerzo, de aquellos que no tienen ese requerimiento de respuesta. Es importante considerar también que esta es la primera vez que se realiza un análisis de estas características en el estudio de conductas emocionales luego de una devaluación de la recompensa. Por lo tanto, los resultados que se presentan a continuación constituyen un análisis exploratorio de los datos obtenidos (siendo considerados resultados preliminares de una primera replica, que será necesario ampliar a futuro).

Así, con el presente diseño, este experimento permite explorar también el efecto de la respuesta instrumental de recorrido sobre las otras variables comportamentales utilizadas para evaluar cambios emocionales.

Materiales y Método

Se usaron 22 sujetos divididos azarosamente en 4 grupos (*Tabla 3.8*): 2 de los grupos fueron idénticos a los del Experimento 6 (grupo Experimental 16/2 y Control 2/2). Los otros 2 grupos también fueron un grupo experimental y otro control, pero que recibieron la recompensa en la caja meta, sin recorrer el corredor recto (grupo Experimental 16/2 CM y Control 2/2 CM). Para esto, los sujetos eran colocados directamente en la caja meta, y luego extraídos después de los 2 minutos

correspondientes al tiempo de reforzamiento de cada ensayo (se conservó el intervalo inter-ensayo de 30 segundos).

Tabla 3.8. Diseño Experimental de pre y post-cambio del Experimento 7. CM: refiere a caja meta.

Grupo	Pre-cambio (12 sesiones;	Post-cambio (8 sesiones;
	4 ensayos c/u)	4 ensayos c/u)
Experimental 16/2 (n=6)	16 micropellets	2 micropellets
Control 2/2 (n=6)	2 micropellets	2 micropellets
Experimental 16/2 CM (n=5)	16 micropellets	2 micropellets
Control 2/2 CM (n=5)	2 micropellets	2 micropellets

Se analizaron las conductas de los sujetos en la sesión 12 (última de pre-cambio) y las sesiones 13, 14 y 15 (primeras 3 de post-cambio).

Análisis de videos:

Se grabaron videos en la caja meta utilizando una webcam (Genius, Ecam 8000 Full HD, China, CA) y se analizaron empleando el software Boris (Behavioural Observation Research Interactive Software; <http://www.boris.unito.it>) (Friard & Gamba, 2016). Se determinó la frecuencia de distintos comportamientos asociados a respuestas de estrés (Figura 3.6).

Variables comportamentales:

1.- Rearing: cuando el animal se para en sus dos patas traseras, apoyándose o no contra las paredes del *runway*. Se contabilizó el total de eventos por sesión y por ensayo.

2.- Ingresos al comedero: cuando el animal mete la cabeza en el comedero. Pueden verse o no las orejas, pero la cabeza siempre está ocluida por la pared del comedero. Se contabilizó el total de eventos por sesión y por ensayo.

3.- Ambulación: se evaluaron “eventos” de ambulación, definido como el lapso entre el inicio del movimiento y el momento en el que el animal se queda quieto. Se contabilizó el total de eventos por sesión y por ensayo.



Figura 2.6. Vista superior de la caja meta en el Experimento 7 donde se pueden observar algunas de las conductas registradas. (a) Ingreso al comedero. (b), (c) y (d) Rearing (fotos obtenidas de los videos analizados).

Resultados

Etapas Pre-cambio:

La Figura 3.7 representa el tiempo de recorrido de los grupos “completos” (que realizaron la tarea instrumental previa). Un ANOVA de medidas repetidas para la etapa pre-cambio indicó que existe un efecto significativo de la Sesión ($F_{(5,355, 53,55)} = 13.77, p < 0.0001$) y del grupo ($F_{(1, 10)} = 10.30, p = 0.0093$).

Etapas Post-cambio:

En el período de post-cambio se encontró un efecto significativo de la interacción Sesión x Grupo ($F_{(7, 70)} = 2.922, p < 0.0097$), pero no se registraron efectos significativos de los demás factores. Un análisis post hoc de LSD arrojó diferencias significativas entre grupos en la sesión 15 ($p < 0.0183$).

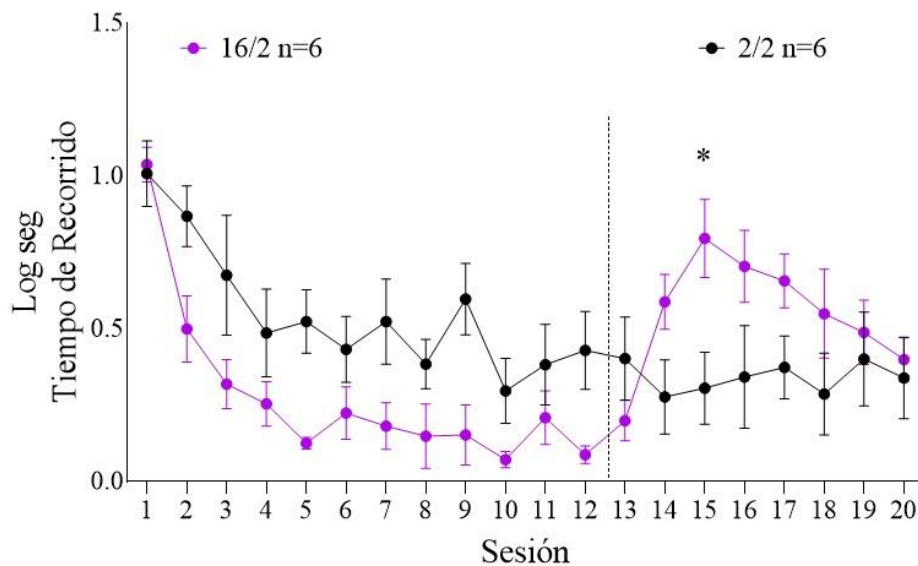


Figura 3.7. Tiempo de recorrido (Log s) para los grupos 16/2 o 2/2 del Experimento 7 a lo largo de las sesiones. Grupo experimental: 16/2. Grupo control: 2/2. La línea punteada refiere al cambio de la recompensa en el grupo experimental.

Análisis de videos:

Ambulación: en las Figuras 3.8, 3.9 y 3.10 se visualizan los promedios de eventos de ambulación por etapa, por sesión y por ensayo, respectivamente.

En primer lugar, se muestran los promedios de eventos de ambulación de cada grupo comparando la etapa pre-cambio con la etapa post-cambio (Figura 3.8).

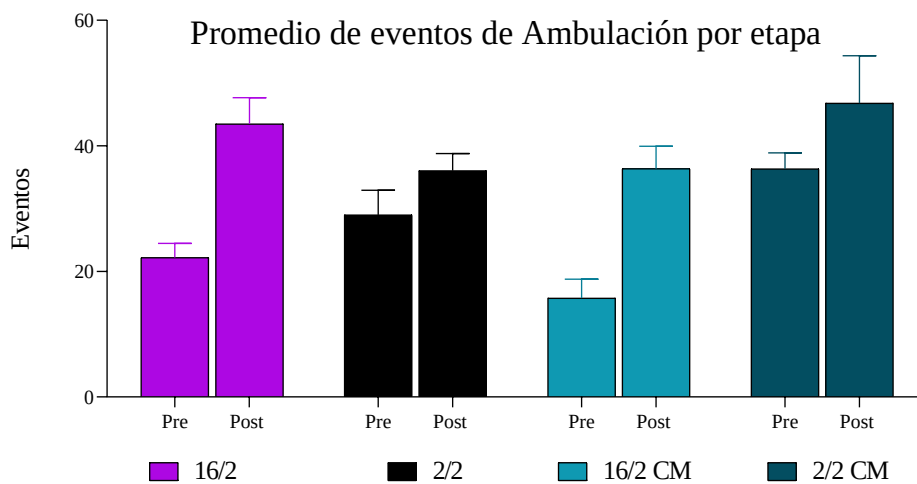


Figura 3.8. Promedio de eventos de ambulación de cada grupo del Experimento 7 en la etapa pre-cambio y en la etapa post-cambio. Grupos experimentales: 16/2 y 16/2 CM (Caja meta). Grupos controles: 2/2 y 2/2 CM (Caja meta).

En el caso de los promedios por etapa, se comparó la última sesión pre-cambio con un promedio de las sesiones 13, 14 y 15 (que corresponden a la primera, segunda y tercera sesión post-cambio). De manera preliminar, se puede observar que los grupos experimentales parecen mostrar un cambio en su conducta, aumentando la cantidad de eventos de ambulación luego de la devaluación de la recompensa. A su vez, para el caso de los grupos que recorren el corredor recto, se observa que el grupo experimental ambula más que el grupo control en la etapa post-cambio. Se realizó un ANOVA de tres vías indicando como factores Etapa, Respuesta (para indicar la condición de respuesta de los sujetos: Instrumental/Caja Meta) y Refuerzo (para indicar el grupo del sujeto: Experimental/Control). El análisis estadístico arrojó un efecto significativo de la interacción Etapa x Recompensa ($F_{(1,18)} = 7.535$, $p < 0.0133$), de la interacción Respuesta x Recompensa ($F_{(1,18)} = 5.899$, $p < 0.0258$). A su vez, se encontró un efecto significativo del factor Recompensa ($F_{(1,18)} = 5.425$, $p < 0.0317$) y del factor Etapa ($F_{(1,18)} = 44.71$, $p < 0.0001$).

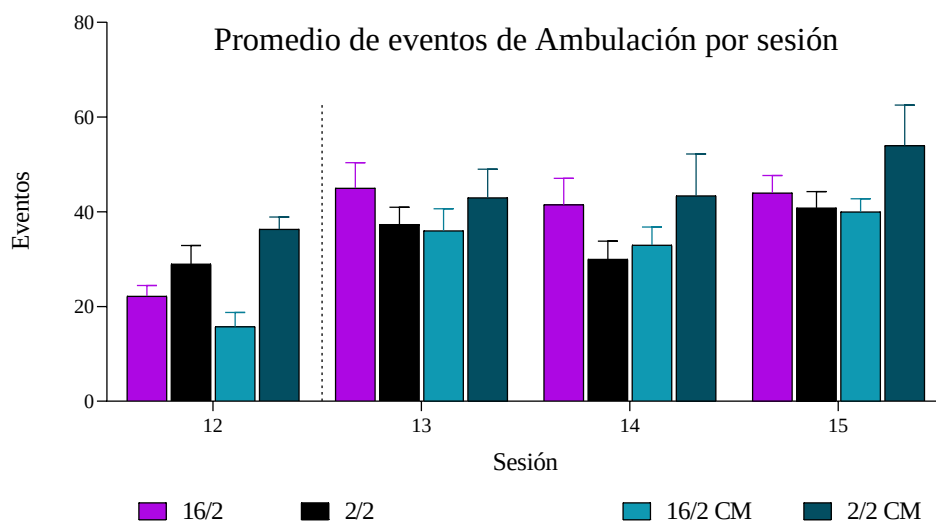


Figura 3.9. Promedio de eventos de ambulación de cada grupo por sesión. Se grafica con línea punteada el comienzo de la etapa post-cambio. Grupos experimentales: 16/2 y 16/2 CM (Caja meta). Grupos controles: 2/2 y 2/2 CM (Caja meta).

A su vez, se analizaron los promedios por sesión (Figura 3.9), para verificar cómo la conducta de ambulación se comportaba a lo largo de las sesiones. Los datos parecen mostrar que luego de la devaluación, los sujetos del grupo experimental 16/2 (“instrumental”) ambulan más en todas las sesiones post-cambio, en comparación con sus controles. Por otro lado, parecería que los animales del grupo experimental

16/2 CM (“Caja meta”) también ambulan más que en la etapa pre-cambio, pero no se replica la misma dinámica que en el caso de los grupos instrumentales. Además, de manera interesante, los sujetos en la sesión 13 ya muestran un cambio en la conducta, que no repercute en la respuesta instrumental. Para comprobar esta tendencia, se realizó un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, para evaluar el efecto del factor Sesión y del factor Grupo. El análisis estadístico arrojó únicamente un efecto significativo de Sesión ($F_{(2,643, 47,58)} = 25.29, p < 0.0001$). Los demás factores no indicaron efectos significativos ($p > 0.5$)

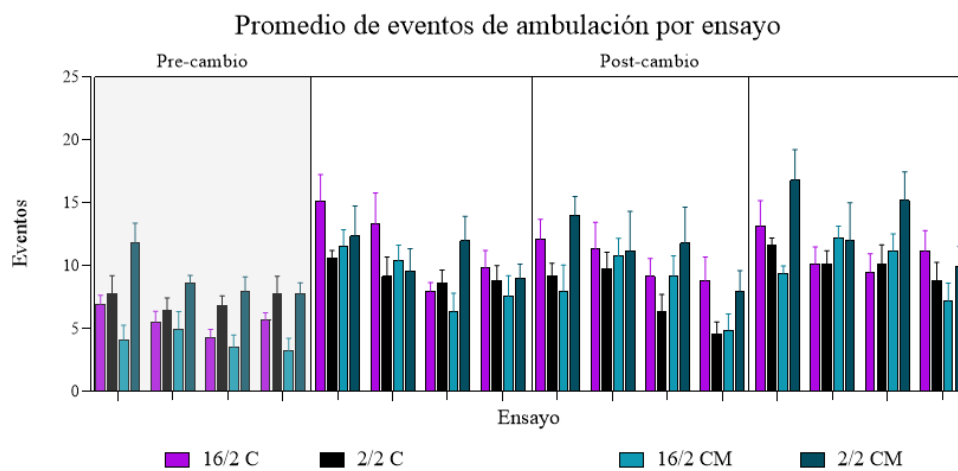


Figura 3.10. Promedio de eventos de ambulación por ensayo (se agrupan dentro de rectángulos todos los ensayos que pertenecen a una misma sesión. Grupos experimentales: 16/2 y 16/2 CM (Caja meta). Grupos controles: 2/2 y 2/2 CM (Caja meta).

Considerando el tipo de desempeño intra-sesión que se discutió en el Experimento 6, se propuso analizar también el comportamiento de la variable ambulación ensayo por ensayo (Figura 3.10). De manera interesante, se observa que el mayor número de eventos de ambulación se da en el primer ensayo post-devaluación en el grupo experimental 16/2 instrumental. A su vez, en este mismo grupo se mantiene una tendencia de desempeño decreciente en todas las sesiones post-cambio, donde el mayor número de eventos se observa en el primer ensayo, y luego disminuye a lo largo de los subsiguientes. Un ANOVA de dos vías, indicó un efecto significativo de la interacción Ensayo x Grupo ($F_{(33, 198)} = 1.552, p < 0.0360$). El análisis post-hoc no detectó diferencias significativas en ninguno de los ensayos post-cambio ($p > 0.5$).

Rearing: En las Figuras 3.11, 3.12 y 3.13 se graficaron los eventos de *rearing* por etapa, por sesión y por ensayo respectivamente. Se realizaron los mismos análisis que para el caso de la ambulación.

En primer lugar, analizando el comportamiento por etapas (Figura 3.11) se observa un aumento de los eventos de *rearing* luego de la devaluación en ambos grupos experimentales.

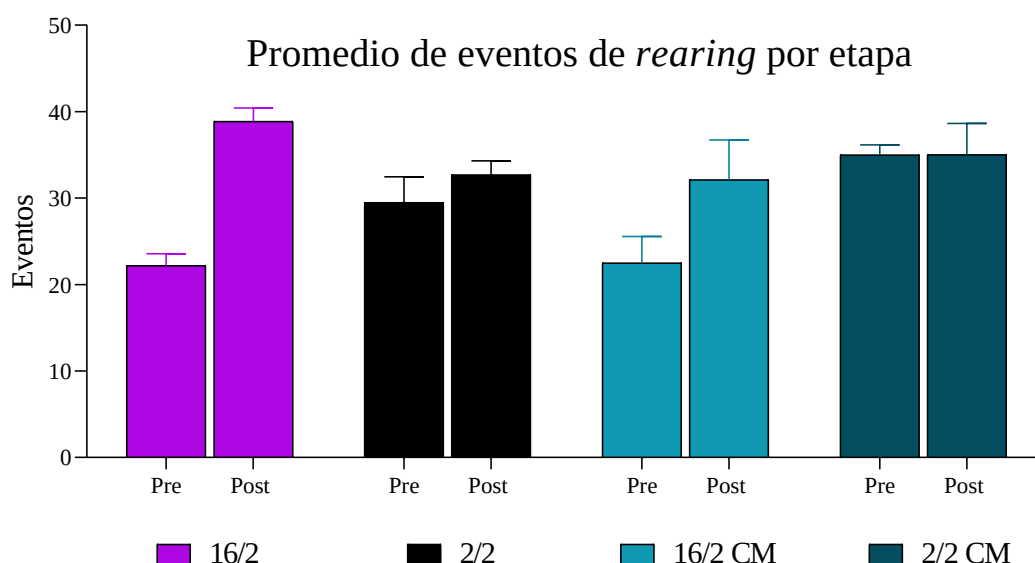


Figura 3.11. Promedio de eventos de *rearing* de cada grupo del Experimento 7 en la etapa pre-cambio y en la etapa post-cambio. Grupos experimentales: 16/2 y 16/2 CM (Caja meta). Grupos controles: 2/2 y 2/2 CM (Caja meta).

Por otro lado, parecería que el grupo experimental 16/2 instrumental, aumenta los eventos de *rearing* aún más que su control, mientras que esta tendencia no se replicaría en los grupos de caja meta. Se realizó un ANOVA de tres vías de medidas repetidas que arrojó un efecto significativo de la interacción Etapa x Recompensa ($F_{(1,18)} = 1.642, p < 0.2163$), del factor Recompensa ($F_{(1,18)} = 5.788, p < 0.0271$) y del factor Etapa ($F_{(1,18)} = 13.69, p < 0.0016$).

Para el caso del promedio de eventos entre sesiones (Figura 3.12), se observa un aumento de dichos eventos en las sesiones post-cambio por parte de ambos grupos experimentales. La tendencia parece indicar que en las sesiones post-cambio los animales del grupo Experimental 16/2 instrumental aumentarían su conducta de *rearing* por encima de los controles, lo que se replica sólo en la primera sesión post-

cambio en los sujetos Experimentales 16/2 CM (caja meta). Un ANOVA de dos vías arrojó un efecto significativo de la interacción Sesión x Grupo ($F_{(9,54)} = 2.424$, $p < 0.0216$). Pero el análisis post-hoc sólo mostró diferencias significativas entre el grupo Experimental 16/2 y el Control 2/2 en la sesión 14 (es decir, la segunda sesión post-cambio) ($p < 0.0009$).

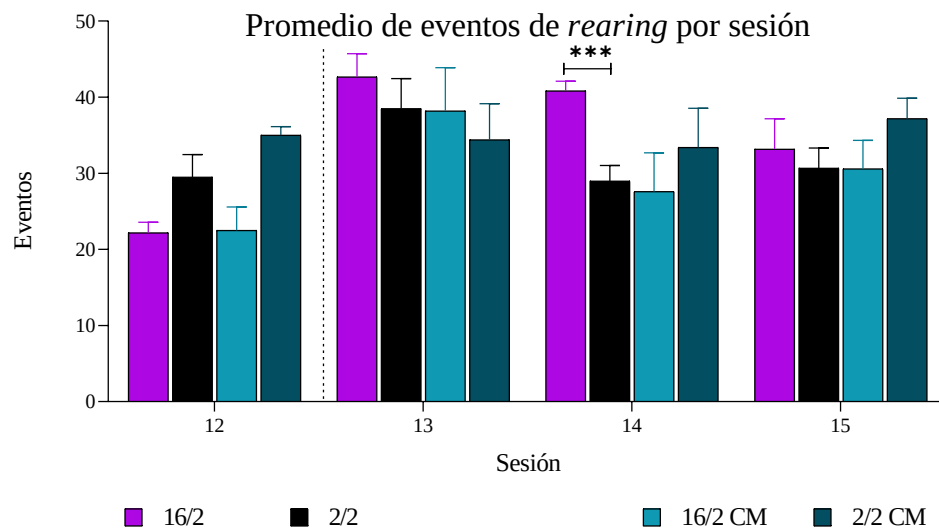


Figura 3.12. Promedio de eventos de rearing de cada grupo por sesión. Se grafica con línea punteada el comienzo de la etapa post-cambio. Grupos experimentales: 16/2 y 16/2 CM (Caja meta). Grupos controles: 2/2 y 2/2 CM (Caja meta).

Para el caso del promedio de eventos por ensayo (Figura 3.13), se observa en general un aumento del *rearing* en los grupos experimentales en comparación con sus controles en ambas condiciones. A su vez, parecería que este efecto se diluye en la última sesión. Sin embargo, el análisis de ANOVA de medidas repetidas del promedio de eventos por ensayo no arrojó efectos significativos de la interacción ($p > 0.08$).

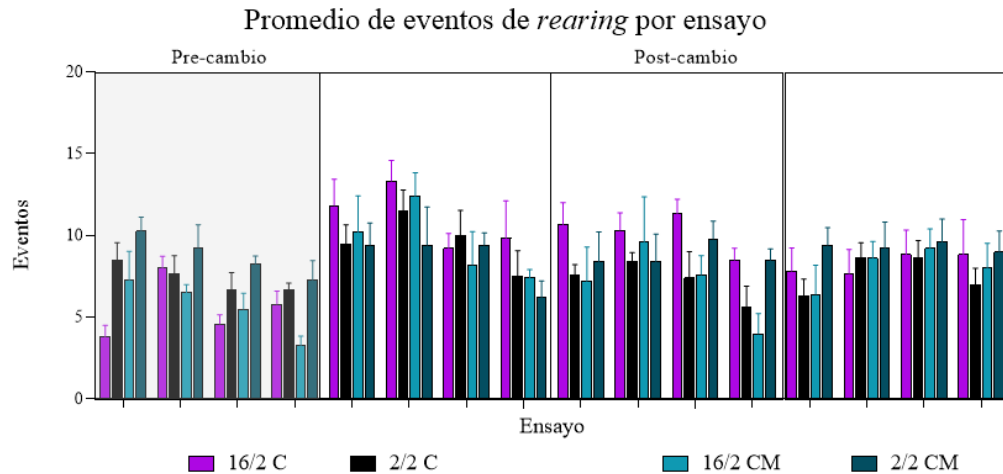


Figura 3.13. Promedio de eventos de rearing por ensayo. Se agrupan dentro de rectángulos todos los ensayos que pertenecen a una sesión. Grupos experimentales: 16/2 y 16/2 CM (Caja meta). Grupos controles: 2/2 y 2/2 CM (Caja meta).

Comedero: En las Figuras 3.14, 3.15 y 3.16 se graficaron los eventos de ingreso al comedero por etapa, por sesión y por ensayo respectivamente.

En el caso de los eventos por etapa (Figura 3.14), parece observarse un efecto opuesto entre los grupos experimentales, ya que los animales del grupo 16/2 instrumental luego del cambio tienden a aumentar sus ingresos al comedero, mientras que los del grupo 16/2 CM (caja meta) tienden a disminuirlos. Sin embargo, un ANOVA de tres vías indicó que no hay efectos significativos de ningún factor (Recompensa, Respuesta y Etapa) ($p > 0.1$).

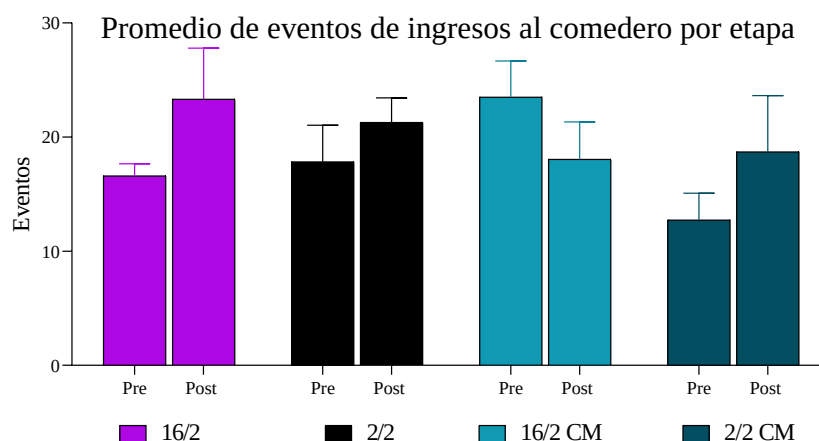


Figura 3.14. Promedio de eventos de ingresos al comedero de cada grupo del Experimento 7 en la etapa pre-cambio y en la etapa post-cambio. Grupos experimentales: 16/2 y 16/2 CM (Caja meta). Grupos controles: 2/2 y 2/2 CM (Caja meta).

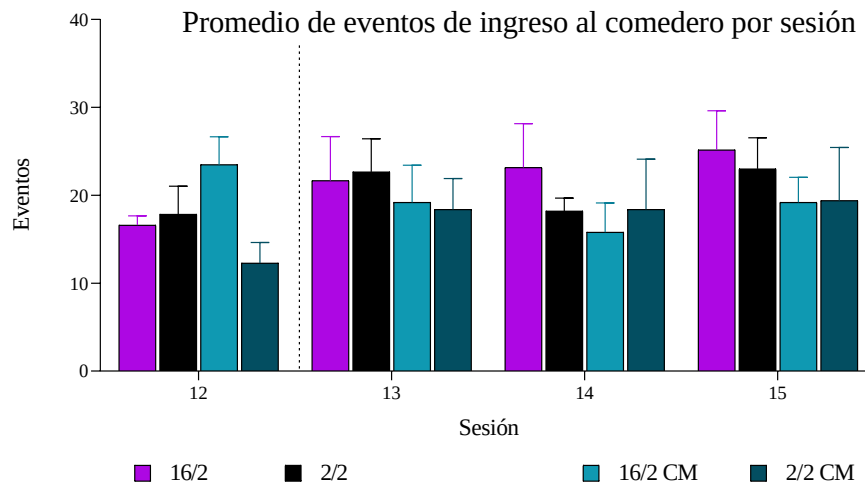


Figura 3.15. Promedio de eventos de ingresos al comedero de cada grupo por sesión. Grupos experimentales: 16/2 y 16/2 CM (Caja meta). Grupos controles: 2/2 y 2/2 CM (Caja meta). Se grafica con línea punteada el comienzo de la etapa post-cambio.

Por otro lado, para el análisis por sesión (Figura 3.15), parece observarse que no hay diferencias entre los grupos en las sesiones post-cambio. Un ANOVA de dos vías no arrojó efectos significativos de ninguno de los factores, ni Sesión ni Grupo ($p > 0.36$).

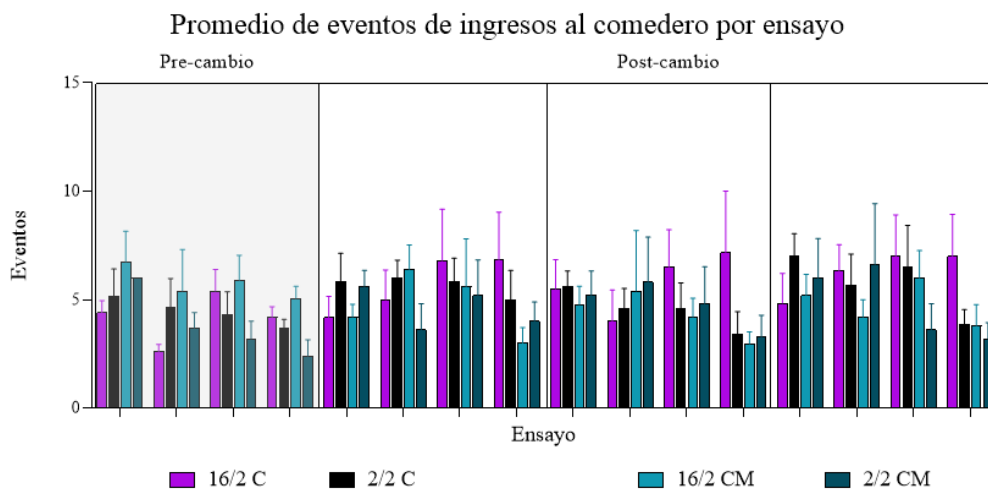


Figura 3.16. Promedio de eventos de ingresos al comedero por ensayo. Se agrupan dentro de rectángulos todos los ensayos que pertenecen a una sesión. Grupos experimentales: 16/2 y 16/2 CM (Caja meta). Grupos controles: 2/2 y 2/2 CM (Caja meta).

En el caso del análisis por ensayo (Figura 3.16), parece que el grupo experimental 16/2 instrumental aumenta la cantidad de eventos de ingreso al comedero en los últimos ensayos de cada sesión, aunque no es una tendencia clara.

En este caso, un ANOVA de dos vías de medidas repetidas (Grupo x Ensayo), tampoco encontró efectos significativos analizando el comportamiento de la variable a lo largo de los ensayos ($p > 0.39$).

Discusión

Es importante destacar que este experimento reproduce el efecto de contraste instrumental mostrado en el Experimento 6, lo cual sugiere que el protocolo desarrollado a lo largo de este capítulo mostró ser consistente y replicable. A su vez, introdujo nuevas variables registradas en el protocolo de CNSi, presumiblemente asociadas a estados emocionales aversivos.

En primer lugar, se logró detectar un aumento significativo en la conducta de ***rearing*** en la segunda sesión post-cambio en la condición instrumental. El ***rearing*** (o exploración vertical) puede ser interpretado como una conducta de escape o comportamiento defensivo, cuando se trata de ambientes aversivos o negativos. En situaciones donde los animales se sienten amenazados o ansiosos, el ***rearing*** tiende a ser un comportamiento dominante en las respuestas iniciales (Lever et al., 2006). Al mismo tiempo, esta conducta también puede relacionarse con la novedad, y está fuertemente ligada a la actividad hipocampal (Lever et al., 2006). Estudios previos en un contexto de disminución de soluciones azucaradas en un *open field*, mostraron aumento de esta conducta, así como de la ambulación (Flaherty et al., 1978). A su vez, estudios en CNSc utilizando soluciones azucaradas y galletitas dulces como recompensas, en una caja de condicionamiento, lograron mostrar el aumento de estas variables al mismo tiempo que una reducción en el consumo de las recompensas menos preferidas (Pellegrini & Mustaca, 2000).

La variable ***ambulaci3n*** parecería también mostrar un aumento luego del cambio en los grupos devaluados, pero se presenta un aumento mayor a sus controles solamente en el caso del grupo 16/2 instrumental. Es decir, se presenta una tendencia similar a la conducta de ***rearing***, aunque no se logró detectar significancia estadística. En general, esta variable está ampliamente utilizada en el contexto de modelos de ansiedad en *open field* (Harro, 2018). Por otro lado, los datos presentados son preliminares dado que la muestra utilizada es pequeña. Los estudios comportamentales en mamíferos, y sobre todo en el estudio de fenómenos emocionales lábiles como es el CNSi, suelen requerir de muestras grandes para obtener resultados significativos estadísticamente. Sin embargo, al ser un

experimento exploratorio, se propuso hacer una discusión de los datos obtenidos a pesar de la falta de significancia estadística.

De manera interesante, estas conductas en el caso de los animales experimentales 16/2 instrumentales aumentan más que sus controles luego del cambio. Esto significa que el cambio en estas conductas no está ligado exclusivamente al tiempo requerido para consumir la recompensa, el cual podría estar influenciando el abanico de comportamientos en la etapa pre-cambio. En la etapa post-cambio, todos los sujetos están consumiendo la misma recompensa, y en esa instancia, los grupos experimentales 16/2 instrumentales muestran diferencias en el promedio de eventos de *rearing* y de ambulación, en comparación con sus controles. Estas diferencias parecerían estar expresando el fenómeno emocional.

A su vez, los resultados de **ingresos al comedero** son interesantes, ya que parece no haber diferencias entre grupos en la etapa post-cambio. Esto podría indicar que hay cierta variabilidad en esta conducta y tal vez no sea representativa del estado emocional del sujeto en el momento de la devaluación. Una de las hipótesis del cambio de conducta luego de la devaluación de una recompensa, responde a este cambio como un aumento de la búsqueda de la recompensa perdida (Elliot, 1928). En este caso, la falta de diferencias en los ingresos al comedero parecería indicar que los sujetos no estarían en búsqueda de la recompensa.

De esta forma, habiendo puesto a punto un procedimiento robusto para registrar el CNSi, surge un nuevo nivel de análisis del fenómeno de contraste instrumental: el estudio de los mecanismos neurales que subyacen al mismo, tratando de diferenciar a los sujetos del grupo 16/2 experimental instrumental, del grupo experimental 16/2 caja meta. En estos dos grupos, la devaluación de la recompensa y la dinámica de entrenamiento es la misma, pero la respuesta conductual ante el cambio sorpresivo no parecería ser igual. Los grupos 16/2 caja meta y 2/2 control caja meta, a su vez, parecen tener un comportamiento distinto en la etapa post-cambio, que no se asemeja a la relación que tiene la condición 16/2 y 2/2 instrumental. El efecto de CNSi ocurre de forma anticipatoria (antes del contacto con la recompensa), durante el recorrido en el pasillo del corredor recto y también una vez que el sujeto entra en la caja meta. El contacto con la recompensa puede producir un efecto de CNSc; es decir, un efecto relacionado con el consumo de la recompensa. Este experimento parece mostrar que estos dos efectos son dissociables, por lo que la devaluación de la recompensa en sí no produce los mismos efectos en los animales

que no ejecutaron una respuesta instrumental para obtenerla. En este sentido, existe evidencia de que la devaluación de sacarosa en un corredor recto no muestra el efecto CNSi; pero los mismos animales muestran efectos CNSc en la caja de meta (Flaherty & Caprio, 1976; Sastre et al., 2005). A su vez, también se observa una disociación de estos efectos en algunos de los mecanismos neurales que los subyacen. Por ejemplo, lesiones del Hipocampo o del Núcleo Accumbens (NAc) interfieren con el efecto CNSi sin afectar el efecto CNSc (Eagle et al., 1999; Flaherty et al., 1998; Leszczuk & Flaherty, 2000). En particular, Leszczuk & Flaherty (2000) plantean que los requisitos energéticos de acercarse a la recompensa desde cierta distancia en el corredor recto hicieron que las ratas fueran más sensibles al efecto de las lesiones en el NAc de lo que ocurría cuando sólo se requería una respuesta consumatoria. La idea de que el NAc puede estar involucrado en esta diferencia del efecto anticipatorio del CNSi tiene que ver con resultados previos, los cuales indican que la interferencia con la transmisión de dopamina en el NAc afecta los aspectos activacionales de la motivación por una recompensa alimenticia, pero deja intactos los aspectos direccionales (Salamone et al., 2017). A su vez, las tareas motivadas por comida, que tienen requisitos de respuesta mínimos, tienden a ser relativamente insensibles a la interferencia con la transmisión de dopamina; mientras que las tareas que implican mayores costos de respuesta tienden a ser más sensibles a las manipulaciones de dopamina. Estos resultados podrían constituir una explicación plausible de los resultados hallados en este experimento: la existencia de diferencias en la variación de la conducta entre los grupos que recorrieron el corredor recto y aquellos que sólo ejecutaban una respuesta consumatoria. Por otro lado, hay una gran cantidad de bibliografía que relaciona aspectos motivacionales con el circuito del refuerzo, la dopamina y con la locomoción. Por ejemplo, las depleciones de dopamina en el NAc, o su antagonismo, suprimen la ambulación inducida por novedad (Salamone et al., 2007). A su vez, la presentación de pellets de comida a ratas con restricción alimentaria puede inducir varios tipos de actividad como correr en rueda y el aumento de la locomoción; justamente, estas actividades han demostrado estar acompañadas por aumentos en la liberación de dopamina en el NAc (McCullough & Salamone, 1992) y suprimidas por depleciones de dopamina en el NAc (McCullough & Salamone, 1992; Robbins & Koob, 1980).

Resulta sumamente interesante entender cómo el esfuerzo por realizar una tarea parece influir en la respuesta de los sujetos ante la devaluación de la

recompensa, y cómo esto también parece estar relacionado con la motivación, lo que se visualiza en la respuesta de frustración. Otra posible explicación de este efecto se puede dar en relación a la formación de la expectativa, porque los sujetos que no recorren el *runway* podrían no generar una asociación fuerte entre la respuesta y la recompensa, como sí sucede en los grupos que pueden anticipar el resultado de su conducta (al menos en la etapa pre-cambio). Esta hipótesis podría ponerse a prueba aumentando el tiempo de exposición con la recompensa en la caja meta. Como se explicó durante este capítulo, el fenómeno de contraste requiere de parámetros mínimos para expresarse, y tal vez se requiera de una experiencia mayor en la tarea y en el aparato para que los sujetos hagan una evaluación certera del incentivo, cuya devaluación evoque una respuesta de frustración.

Conclusión general

Los resultados de este capítulo dieron cuenta de los parámetros necesarios para obtener un efecto consistente de CNSi. El protocolo con ensayos masivos utilizado en el Experimento 6, logró registrar luego de la devaluación un deterioro significativo del tiempo de recorrido en los sujetos experimentales, en comparación con el grupo control. Este empeoramiento de la respuesta podría ser explicado entonces, por el proceso emocional que aparece como consecuencia de la violación de la expectativa. El hecho de que el efecto de CNSi dependa de un número mínimo de ensayos antes del cambio y de una disparidad mínima entre recompensas, es consistente con la mayoría de las explicaciones cognitivas del fenómeno. Como se ha descrito en la Introducción, el paradigma de contraste instrumental requiere de la formación y mantenimiento de una conducta anticipatoria, que está modulada por la motivación y por la expectativa. El uso de ensayos masivos aumenta el grado de asociación de los estímulos condicionados con la recompensa, por lo que cuanto mayor sea la disparidad de recompensas, mayor será la disminución de la generalización entre los estímulos y, por lo tanto, mayor será la interrupción del comportamiento anticipatorio (Capaldi, 1972).

Por otro lado, la extensa práctica en un contexto particular (como en el caso del Experimento 6), genera una expectativa fuerte que es reactivada cuando se vuelve a poner al animal en el corredor recto, y de esta manera se realimenta la ejecución de la conducta guiada por el objetivo. El cambio en la recompensa, cuando es lo suficientemente grande, dispara la respuesta a de frustración; en tanto que en las

exposiciones posteriores (que ocurren en la misma sesión), reactivan la memoria de la recompensa devaluada (ahora sorpresivamente pequeña) y del estado emocional negativo. Por lo tanto, deterioran la respuesta instrumental guiada por el objetivo y promueven respuestas de alejamiento (que se expresan como un aumento desproporcionado del tiempo de recorrido).

Al mismo tiempo, el Experimento 7 (usando el mismo protocolo del Experimento 6) parecería indicar que es importante la ejecución de la respuesta instrumental para que se observe el efecto emocional del fenómeno de CNSi. Los animales devaluados de la condición instrumental muestran un cambio mayor en el comportamiento, relacionado a un aumento en las conductas de *rearing* y ambulación, respecto de los sujetos del grupo caja meta. De esta manera, se puede sugerir que la valuación que hacen los sujetos del incentivo es diferente en cada condición. Los sujetos de la condición instrumental parecen hacer una valuación mayor del incentivo, por lo que una devaluación de 8 veces su valor repercute directamente en el desempeño y en la conducta.

Finalmente, es importante destacar que el desarrollo de este protocolo robusto de CNSi presentado en este capítulo, ha posibilitado el inicio de nuevas líneas de investigación en nuestro laboratorio. Por ejemplo, en un trabajo reciente (Rodríguez et al., 2024) se han podido estudiar los efectos de la transferencia entre una tarea de contraste consumatoria y una tarea instrumental, empleando los parámetros utilizados en los Experimentos 6 y 7 de esta Tesis para la tarea de CNSi.

Capítulo 4

**Registros de la actividad de la corteza prefrontal medial durante el
Contraste Negativo Sucesivo instrumental**

La corteza prefrontal (CPF; *PFC* por sus siglas en inglés) es el área cortical de aparición más reciente desde el punto de vista evolutivo, y anatómicamente se ha definido como el área de corteza del polo rostral, anterior a la corteza motora y pre-motora del cerebro de mamíferos (Laubach et al., 2018). Dentro de ella se pueden diferenciar tres regiones: la corteza insular (INS), la corteza orbitofrontal (ORB) y la corteza prefrontal medial (CPFm). Funcionalmente se ha descrito como una región clave en la realización de las llamadas “funciones ejecutivas”, entre las que encontramos la atención, la memoria de trabajo y la flexibilidad conductual, entre otras (Pastor & Medina, 2021).

Se ha implicado a varias regiones de la CPF en diversos procesos psicológicos, incluidas especialmente las respuestas anticipatorias (Passingham & Wise, 2012). Particularmente, la corteza prefrontal medial (CPFm) es una estructura crítica para la flexibilidad comportamental. En ratas, se ubica en la región central de la corteza prefrontal y se compone de la corteza prelímbica (PL), la corteza infralímbica (IL) y la corteza cingulada (ACC, por sus siglas en inglés). Dentro de la CPFm existen microcircuitos locales altamente recurrentes e interconectados, para la inhibición o excitación de otras áreas dentro de la CPFm, siendo estas conexiones glutamatérgicas y gabaérgicas (Howland et al., 2022).

A nivel funcional, varios estudios han vinculado a la PL con la respuesta condicionada y a la IL con la extinción de dicha respuesta, tanto en tareas apetitivas como aversivas (Fitzgerald et al., 2014; Giustino et al., 2016). A su vez, estudios electrofisiológicos en distintos paradigmas indicaron que la PL y la IL actúan cooperativamente para detectar y desambiguar múltiples señales en el entorno, para permitir el despliegue de la respuesta conductual más apropiada en una situación dada (Eddy et al., 2016; Howland et al., 2022). La ACC ha sido implicada en una variedad de conductas relacionadas con el aprendizaje instrumental. Por ejemplo: la detección de errores, el monitoreo de conflictos entre estímulos, y las conexiones entre esta estructura y el NAc parecen estar involucradas en la regulación de la conducta ante reforzadores alternativos (Cardinal et al., 2002). A su vez, la ACC también ha sido implicada en guiar la toma de decisiones esfuerzo-recompensa. Esto proviene de una serie de estudios que muestran que las ratas con lesiones en esta estructura están menos dispuestas a trepar una barrera de malla de alambre para alcanzar una recompensa grande, optando en cambio por perseguir una recompensa más pequeña pero más fácil de alcanzar (Rudebeck et al., 2006; Walton et al., 2002).

Una de las características más importantes de la CPFm que podría verse involucrada con el fenómeno de contraste es la referida a su participación en el circuito del refuerzo. Una parte fundamental de este circuito incluyen a los núcleos de neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral (ATV; llamada también por sus siglas en inglés VTA) y la sustancia nigra (SN). Estudios preclínicos en animales han demostrado que la manipulación de dopamina mediante el bloqueo de receptores en la CPFm, conducen a déficits en tareas que requieren que los animales ignoren una estrategia conductual previamente beneficiosa y se comprometan en una nueva o anterior (Winter et al., 2009). Así, la actividad dopaminérgica en la CPFm parece promover la flexibilidad conductual que se observa como un cambio de estrategia, algo necesario para que se exprese el fenómeno de CNS.

La CPFm tiene además importantes conexiones recíprocas con estructuras subcorticales que han mostrado estar implicadas en los fenómenos de CNS (y que también están implicadas con el circuito del refuerzo); por ejemplo, el NAc. La CPFm establece conexiones con el NAc de manera directa e indirecta, y la activación de estas conexiones contribuyen también a la liberación de dopamina (Pascoli et al., 2014). Algunos estudios sugieren que las conexiones entre la CPFm y el NAc, tanto directas como multisinápticas (o indirectas), influyen en la ejecución de tareas relacionadas con el control cognitivo y la memoria de trabajo, aspectos que son fundamentales para las funciones de la CPFm (Cools & D'Esposito, 2011). A su vez, las proyecciones glutamatérgicas desde la CPFm hacia el NAc podrían estar implicadas en la selección entre respuestas adaptativas y la supresión de respuestas competitivas (Howland et al., 2022).

En cuanto a las sub-regiones dentro de la CPFm, se observa una dicotomía funcional en las conexiones entre la PL y la IL que se mantienen en gran medida segregadas. Se ha demostrado que la vía PL hacia el centro del NAc está involucrada en la expresión de comportamientos de búsqueda de recompensa, mientras que la vía IL hacia la periferia del NAc está involucrada en la inhibición (Peters et al., 2009). En relación con la expresión y la continuidad de conductas de búsqueda de refuerzos apetitivos, en un estudio realizado por Ishikawa et al. (2008a) se encontró que la inactivación farmacológica de la PL suprimía la actividad neuronal en el NAc durante la búsqueda de sacarosa bajo el control de un estímulo discriminativo. Además, se ha demostrado que la activación optogenética de las aferencias de la PL al NAc mejora la adquisición de la búsqueda condicionada de sacarosa, mientras que

la inhibición reduce dicha búsqueda condicionada (Otis et al., 2017). Por su parte, aumentar la actividad del circuito IL-NAc promueve la recuperación de la extinción (Augur et al., 2016; Peters et al., 2009). La inactivación farmacológica de la IL cambia el patrón de actividad de las neuronas del NAc, lo que hace que se activen ante señales de No-Recompensa (Ghazizadeh et al., 2012). A su vez, después de desconectar el circuito entre la IL y el NAc, algunos estudios indicaron efectos de desinhibición; es decir, no se suprimen respuestas ante señales irrelevantes o que no resultan exitosas (Keistler et al., 2015). A su vez, se ha implicado a las conexiones entre el NAc y la ACC en el comportamiento dirigido a objetivos, ya que la depleción de los inputs de la ACC en el NAc resulta en un déficit en la ejecución de tareas instrumentales de palanqueo por la obtención de alimento (Parkinson et al., 2000). Por otro lado, se ha vinculado esta vía en la toma de decisiones orientada al balance esfuerzo-refuerzo (Floresco, 2015). Estas interacciones entre las subregiones de la CPFm y el NAc parecen resultar fundamentales para la expresión del fenómeno de CNSi, ya que permiten ejecutar la flexibilidad conductual necesaria para la aparición del efecto generado por la devaluación del refuerzo. En este sentido, estudios de lesión en el NAc mostraron efectos distintos en paradigmas instrumentales y consumatorios de contraste (para una revisión, ver Fernández et al., 2024). Por ejemplo, Leszczuk & Flaherty (2000) observaron que la lesión del NAc eliminaba el CNSi, pero no afectaba a la respuesta de CNSc. En este estudio, los animales con lesión del NAc fueron capaces de adquirir la respuesta instrumental en el corredor recto en la fase pre-cambio. En la fase post-cambio, la degradación del incentivo debería haber alterado la motivación del animal para ir hacia la caja meta, aumentando la motivación para escapar del aparato o buscar reforzadores alternativos. Sin embargo, los animales lesionados no mostraron esta conducta. Por lo tanto, el NAc podría ser entonces responsable de este tipo de funciones.

Otra estructura fundamental en el circuito del refuerzo y por su conexión con la CPFm es la amígdala. Hay evidencia que la PL y la IL tienen conexiones recíprocas con la amígdala y éstas ejercen un control sobre el comportamiento de miedo (Arruda-Carvalho & Clem, 2015). De hecho, existe evidencia que apoya el papel de la vía PL-ABL (amígdala basolateral; *BLA* por sus siglas en inglés) en la adquisición y expresión del miedo condicionado (Arruda-Carvalho & Clem, 2014), aunque el compromiso de esta vía parece depender del tiempo (Do-Monte et al., 2015). Por el contrario, se cree que la IL promueve la extinción, al activar neuronas

inhibidoras en la ABL, que a su vez inhibe la salida de la amígdala central (ACe; CeA por sus siglas en inglés) (Berretta et al., 2005; Quirk et al., 2003). La extinción del miedo también altera las propiedades sinápticas de la vía IL-ABL, y la inactivación de la vía IL-ABL durante la extinción perjudica la recuperación de la extinción al día siguiente. Adicionalmente, la ABL forma parte del circuito del refuerzo, codificando las valencias de estímulos biológicamente relevantes. Dentro de esta estructura existen neuronas glutamatérgicas que proyectan a la CPFm y al NAc (Phillips et al., 2003). Uno de los mecanismos por los cuales las distintas redes dentro de la amígdala pueden coordinar respuestas comportamentales opuestas, es a partir de diferentes conexiones río abajo hacia distintas áreas del cerebro. Por ejemplo, la fotoactivación de los terminales axónicos de la ABL en la PL, el hipocampo ventral y la ACe provoca comportamientos defensivos y relacionados con la ansiedad; mientras que la fotoactivación de los terminales axónicos de la ABL en el NAc provoca comportamientos apetitivos y promueve la respuesta instrumental (Howland et al., 2022). A su vez, la conexión entre la ACC y la amígdala puede modular la respuesta de miedo, ya que la fotoactivación de las terminales producen un aumento de la adquisición y la expresión de la respuesta de miedo ante un estímulo condicionado (Bissière et al., 2008). En el Capítulo 1 se relevó la información disponible sobre la amígdala en el fenómeno de contraste, y los estudios indican que una eliminación de esta estructura a partir de una lesión, impide la expresión de la respuesta de frustración (Becker et al., 1984; Kawasaki et al., 2017; Salinas et al., 1996).

Como se ha descripto anteriormente, el efecto de contraste se explica según la Teoría de la Frustración, por la aparición de respuestas relacionadas a emociones negativas, como el estrés y la ansiedad (Amsel, 1992, Papini 2003). Los fenómenos derivados de la frustración por ausencia u omisión del refuerzo dependen de estructuras cerebrales implicadas en otros procesos emocionales más primitivos, como la respuesta de miedo. Por este motivo, es posible pensar que la evolución haya reclutado estructuras telencefálicas primitivas involucradas en fenómenos comportamentales como la evitación o el *freezing* para dar lugar a nuevos fenómenos comportamentales como el CNS (Papini et al 2022). Por ejemplo, podemos observar que tanto peces y anfibios cuentan con estructuras regiones cerebrales homólogas de la amígdala de los mamíferos (González & Northcutt, 2009; Medina & Abellán, 2009; Medina et al., 2011; Moreno & González, 2004, 2006; Moreno et al., 2009) y,

si bien presentan conductas caracterizables como respuesta de miedo, no presentan efecto de CNS. Por ejemplo, en peces dorados (*Carassius auratus*) no se lograron obtener evidencias de CNS devaluando recompensas apetitivas (Couvillon & Bitterman, 1985; Lowes & Bitterman, 1967), observándose un efecto lineal de ajuste de la respuesta a las nuevas condiciones del reforzamiento. Este tipo de resultados también se replica en anfibios (en el sapo terrestre *Rhinella arenarum*) y se ha denominado “Contraste inverso” (Daneri et al., 2007; Muzio et al., 2011). En el caso de las aves, se ha comprobado que hay inconsistencias entre diferentes especies. Por ejemplo, en estorninos se ha observado un efecto de CNSc, mientras que en palomas no se ha podido establecer un fenómeno de CNSi. Esto podría reflejar diferencias en términos de especies (estorninos vs. palomas), parámetros de recompensa (calidad versus magnitud), o parámetros de respuesta (consumatorio versus instrumental) (Papini et al., 2022). Con los resultados obtenidos hasta el momento, se puede desprender que los mecanismos neurales subyacentes a las respuestas de frustración requieren de estructuras corticales específicas; y a su vez, la aparición de estas estructuras también define un cambio evolutivo en el nivel de procesamiento de los estímulos. En este sentido, Stout et al. (2002, p. 255) sugirieron que la función adaptativa de los mecanismos cerebrales que respaldan la frustración es facilitar un cambio "de respuestas previamente exitosas que ya no funcionan, a nuevas respuestas que pueden llevar al animal al contacto con los recursos necesarios". La alta demanda energética que requiere el cerebro de los mamíferos, podría ser clave para la conservación de conexiones neuronales y procesos cognitivos que permiten la modificación rápida de estrategias comportamentales en relación a estímulos cambiantes en el ambiente, en general asociados a refuerzos apetitivos alimenticios (Stout et al., 2002). Como se detalló anteriormente, la CPFm es la estructura por excelencia que permite esta flexibilidad cognitiva, y por este motivo resultaría fundamental para el fenómeno de CNSi.

En resumen, la CPFm posee conexiones con estructuras claves del circuito de la recompensa como el NAc, la VTA y la amígdala. Las proyecciones que conectan la CPF, la amígdala y el NAc en conjunto constituyen la vía meso-cortico-límbica, cuyo funcionamiento guía el aprendizaje asociativo en tareas operantes (Abraham et al., 2014). Así, se observa que estructuras de la CPF modulan la expresión o inhibición de conductas instrumentales en paradigmas en los cuales las condiciones de reforzamiento son alteradas. Por otro lado, estudios comportamentales realizados

en especies de grupos filogenéticamente antiguos, como peces y anfibios (representantes actuales de ancestros de los mamíferos), que carecen de modulación cortical de las regiones límbicas, muestran una ausencia de fenómenos de CNS. Por lo tanto, la evidencia funcional y comparativa con la que contamos hasta el momento, indica que para avanzar en la comprensión de las bases neurales del CNS se requiere de una comprensión adecuada y profunda del rol de la CPFm en este fenómeno. Los estudios de lesiones de la CPFm disponibles no han sido esclarecedores, ya que la lesión permanente parece afectar a los animales ya desde la fase pre-cambio, por lo que es difícil interpretar los resultados de estos estudios (Gurowitz et al., 1970; Lin et al., 2009; Ortega et al., 2011, 2013; Pecoraro et al., 2008). El estudio del papel que cumple esta región en la expresión del fenómeno de CNS parece requerir de otro tipo de técnicas, como la inhibición transitoria (e.g., mediante técnicas de optogenética) o estudios de registros de actividad cerebral. Así, en este capítulo se presentan una serie de estudios iniciales orientados a describir el funcionamiento de la CPFm luego de la devaluación de un incentivo.

En particular, se realizaron dos experimentos con el objetivo de describir la actividad de la corteza pre-frontal en la respuesta de frustración por la devaluación sorpresiva de un incentivo:

En el Experimento 8, se entrenaron animales utilizando el protocolo de entrenamiento masivo puesto a punto en el Experimento 6 para medir la actividad celular en la CPFm mediante la técnica de inmunohistoquímica para c-Fos. Este es un protooncogen que codifica para una proteína (denominada Fos), la cual participa en el control de la transcripción, regulando la expresión de otros genes que participan en la proliferación y diferenciación celular (Herrera & Robertson, 1996). Resulta ser una herramienta muy útil para medir el grado de activación de una célula, porque su expresión en el estado de reposo es muy baja y aumenta rápidamente luego de la activación por estímulos determinados. En estudios previos en ratas, se observó que en una situación de CNSc había un aumento de la expresión de c-Fos en la ACC, la IL y la PL luego de la devaluación en el día 1 post-cambio (Pecoraro & Dallman, 2005). Por otro lado, en el Experimento 8 también se midieron las variables conductuales que fueron descriptas y analizadas en el Experimento 7.

Finalmente, en el Experimento 9 (último experimento de esta Tesis), se usó una técnica electrofisiológica para medir la actividad de neuronas en la CPFm durante un evento de frustración, en animales en un protocolo de cabeza fija (Mininni

et al., 2017; Pereyra et al., 2021), empleando en este caso como recompensa soluciones azucaradas. De esta manera, se buscó caracterizar el patrón de respuesta de las neuronas de esta área en el momento de la devaluación.

Experimento 8: Inmunohistoquímica de c-Fos

Como se indicó previamente, en este experimento se entrenaron animales utilizando el procedimiento desarrollado en el Experimento 6 (el cual consta de un entrenamiento masivo de 12 sesiones de pre-cambio -4 ensayos por sesión-, y una disparidad en la recompensa de 16/2 pellets). El objetivo en este caso fue medir la actividad celular en la CPFm en el momento posterior a la devaluación del incentivo (utilizando como herramienta inmunohistoquímica para detectar activación neuronal a la técnica de c-Fos).

Materiales y métodos

Un total de 24 sujetos fueron distribuidos azarosamente en 4 grupos: Experimental 16/2, Control 2/2 y Control 16/16. A estos tres se le sumó un último grupo denominado “*Room control*” (RC), integrado por sujetos que siempre permanecieron en sus cajas de alojamiento, y nunca fueron entrenados.

Para la etapa pre-cambio, todos los sujetos, excepto los animales RC, fueron entrenados bajo las mismas condiciones empleadas en el Experimento 6 y 7. Luego, al finalizar la primera sesión post-cambio, estos animales fueron anestesiados, perfundidos y sus cerebros extraídos para su análisis posterior. Adicionalmente, para todos los sujetos se registraron las variables *rearing* y ambulación en la última sesión pre-cambio y la primera (y única) post-cambio. El orden en que fueron sacrificados los animales fue contrabalanceado entre los grupos.

En este experimento, teniendo en cuenta los resultados previos que indican que en el primer día post-cambio existen evidencias de una respuesta emocional negativa luego de la devaluación (aunque esto no se evidencia en cambios en el desempeño instrumental), se propone analizar si la actividad de la corteza pre-frontal también se observa desde la primera exposición a la nueva recompensa. A su vez, en un estudio similar midiendo c-Fos en CNSc, se encontró que existe una mayor actividad de las tres sub-áreas de la CPFm en el primer día post-cambio (Pecoraro & Dallman, 2005).

Tabla 4.1. Diseño Experimental de pre y post-cambio del Experimento 8.

Grupo	Pre-cambio (12 sesiones; 4 ensayos c/u)	Post-cambio (1 sesión; 4 ensayos)
Experimental 16/2	16 micropellets	2 micropellets
Control 2/2	8 micropellets	2 micropellets
Experimental 16/16	16 micropellets	16 micropellets

Inmunohistoquímica:

Las ratas fueron anestesiadas con una dosis única de ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) una hora después de finalizado el primer ensayo de la sesión de 4 ensayos. Este período de tiempo fue elegido en base a un estudio realizado en el paradigma consumatorio de CNS, que mostró que la ventana de tiempo óptima para obtener una marca robusta de c-Fos era una hora luego de comenzado el entrenamiento (Pecoraro & Dallman 2005). Los animales fueron perfundidos transcardíacamente con 60 ml de una solución salina y 60 ml de paraformaldehído al 4% (PFA). Los cerebros fueron extraídos y almacenados en PFA *overnight*. Al día siguiente, fueron lavados con PBS durante 6 horas y luego almacenados en una solución conservadora de fosfato (50% de buffer de fosfato, 35% de glicerol y 15% de etilenglicol) a 4 °C. Se realizaron secciones coronales de 50 µm de grosor utilizando un vibrátomo (PELCO easiSlicer, TED Pella, Redding, CA) desde Bregma 3.72 mm hasta 2.28 mm siguiendo el atlas de ratas de Paxinos & Watson (1997). Se obtuvieron cinco secciones de la corteza prefrontal a lo largo del eje rostro-caudal de cada cerebro. Las secciones se colocaron en placas de 24 wells, se lavaron con PBS tres veces durante 5 minutos en agitación constante. Luego, se trataron con peróxido de hidrógeno al 1% diluido en una solución de metanol al 50% y PBS al 50% para bloquear la peroxidasa endógena durante 30 minutos. Las secciones posteriores del cerebro fueron preincubadas en suero de caballo al 10% durante 30 minutos, y luego se mantuvieron durante la noche a 24 °C con una dilución 1/1000 del anticuerpo primario anti proteína Fos (c-Fos E-8, IgG1 monoclonal de ratón; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) en PBS que contenía 0.2% de Tritón y 1% de suero de caballo. Después de lavar con PBS (3 x 5 min), las secciones se incubaron en una solución de PBS de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón biotinilado (Vector

Laboratories, Burlingame, CA) diluido 1/200 en suero de caballo al 3% y Tritón al 0.2% durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, las secciones se lavaron (3 x 5 min) en PBS y se incubaron con un complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La revelación se llevó a cabo utilizando diaminobencidina tetrahidrocloruro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a 0.15 mg/mL que contenía 0.01% de peróxido de hidrógeno. Todas las reacciones se realizaron durante 7 minutos antes de detenerse enjuagando las secciones (3 x 10 min) en PBS. Las secciones de todos los grupos experimentales se montaron y procesaron simultáneamente bajo condiciones de operación idénticas.

Conteo de células positivas de c-Fos: La expresión de tinción positiva para c-Fos se evaluó en las siguientes regiones de la corteza prefrontal: corteza cingulada (ACC), corteza prelímbica (PL) y corteza infralímbica (IL). Las secciones del cerebro (Bregma 2.28-3.72 mm; Paxinos & Watson, 1997) se adquirieron a la misma magnificación (100x) utilizando un microscopio de luz Leica DM500 equipado con una cámara a color Insight ICC50 (Leica Biosystems, Deer Park, IL). Las imágenes se obtuvieron utilizando condiciones de operación idénticas, como el haz de luz y la longitud de onda, se procesaron utilizando el software ImageJ (NIH, <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>) y se convirtieron en valores binarios (cada píxel negro o blanco). Las células c-Fos positivas fueron identificadas automáticamente por el software mediante la umbralización de objetos con un valor de circularidad de 0.98-1.00, coincidiendo con núcleos positivos para c-Fos. Para cada región estudiada, se aplicó el mismo umbral de escala de grises para determinar la intensidad de las células c-Fos positivas (Umbral = 130). Se evaluaron células c-Fos positivas cada cinco secciones a lo largo de todo el eje rostro-caudal de cada región analizada. Se analizó el mismo número de secciones en cada grupo experimental. Los resultados se expresaron como el promedio de densidad celular (es decir, número de células c-Fos positivas por mm²) en todas las secciones contadas para cada animal (*Figuras 4.1 y 4.2*).

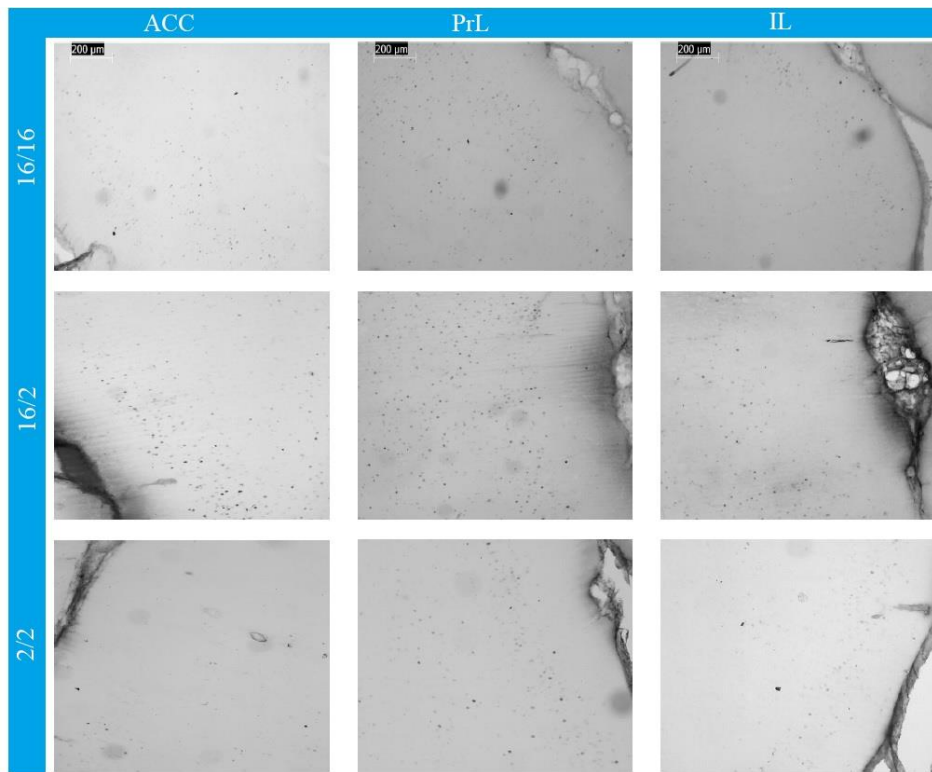


Figura 4.1. Imágenes tomadas en el microscopio de células positivas para *c-Fos* en cada sub-área analizada para cada uno de los grupos del Experimento 8. Regiones: Corteza cingulada (ACC), Corteza prelímbica (PL) y Corteza infralímbica (IL).

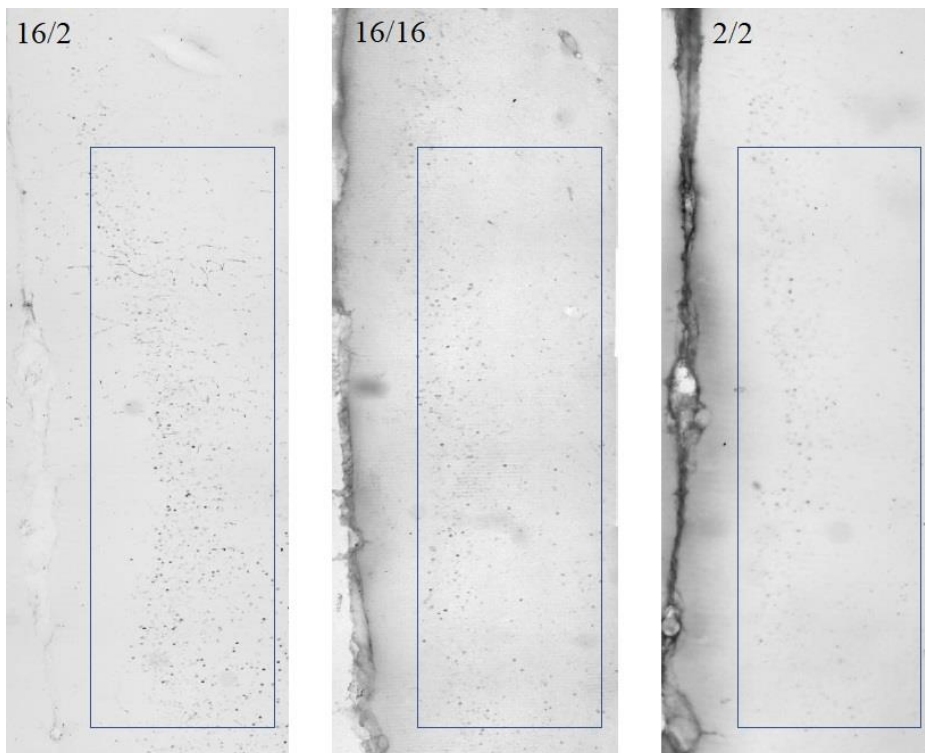


Figura 4.2. Merge de imágenes tomadas en el microscopio de la CPFm de un sujeto de cada grupo (16/2, 16/16 y 2/2) del Experimento 8.

Resultados

En la *Figura 4.3a* se observa el tiempo de recorrido expresado en logaritmo de segundos. Un ANOVA de medidas repetidas Grupo x Sesión de las sesiones pre-cambio mostró un efecto no significativo de la interacción ($p > 0.5$), un efecto significativo del factor grupo ($F_{(2,18)} = 8.427$, $p < 0.003$) y a lo largo de las sesiones ($F_{(5,356, 96,41)} = 52.22$, $p < 0.0001$). Las comparaciones posteriores indicaron una diferencia significativa entre el Grupo 2/2 y los otros dos grupos ($p < 0.01$). La *Figura 4.3b* muestra los tiempos de recorrido de la última sesión pre-cambio y la primera (y única) sesión post-cambio. Para analizar estos datos se realizó un ANOVA de medidas repetidas para los factores Grupo y Sesión. Los resultados indican únicamente un efecto significativo de Grupo ($F_{(2,18)} = 4.411$, $p < 0.028$). El análisis post-hoc indicó diferencias entre el grupo Control 2/2 y los demás grupos ($p < 0.03$).

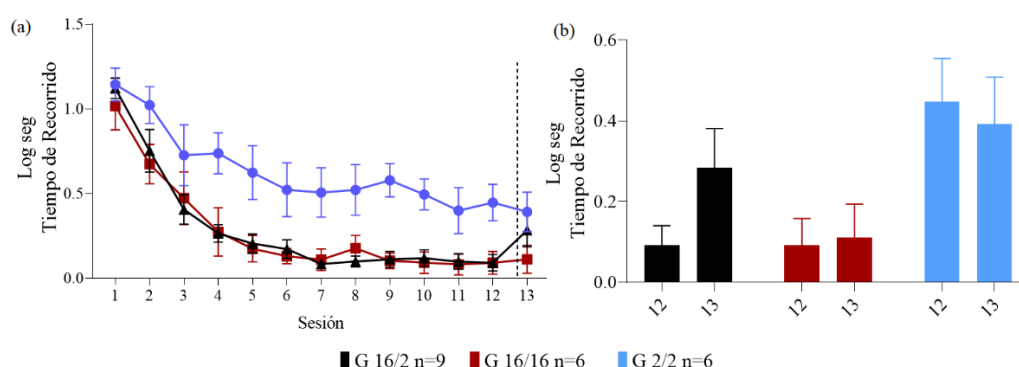


Figura 4.3. (a) Tiempo de recorrido (Log s) para todos los grupos del Experimento 8 a lo largo de las sesiones. La línea punteada refiere al cambio de la recompensa en los grupos experimentales. (b) Tiempos de recorrido (Log s) de la última sesión pre cambio (12) y la primera sesión post-cambio (13). Grupo experimental: 16/2. Grupos controles 2/2 y 16/16.

Por otro lado, se analizaron las variables comportamentales de ambulación y *rearing* por sesión (*Figura 4.4*). Para el caso de la ambulación, un ANOVA de medidas repetidas para los factores Grupo y Sesión mostró un efecto significativo de la interacción ($F_{(2,17)} = 16.26$, $p < 0.0001$). Las comparaciones post-hoc indicaron diferencias significativas entre etapas para el Grupo 16/2 ($p < 0.0001$). Por otro lado, en el caso del *rearing*, el ANOVA también indicó un efecto significativo de la interacción ($F_{(2,17)} = 8.548$, $p < 0.0027$). El análisis de LSD Fisher indicó diferencias

significativas entre sesiones para el Grupo 16/2 ($p < 0.0001$). El resto de las comparaciones no fueron significativas ($ps > 0.05$). A su vez, un ANOVA de una vía para la sesión 13 mostró diferencias significativas entre grupos ($F_{(2, 17)} = 11.20$, $p < 0.0008$). Las comparaciones múltiples arrojaron diferencias significativas entre el Grupo 16/2 y los demás grupos ($p < 0.003$).

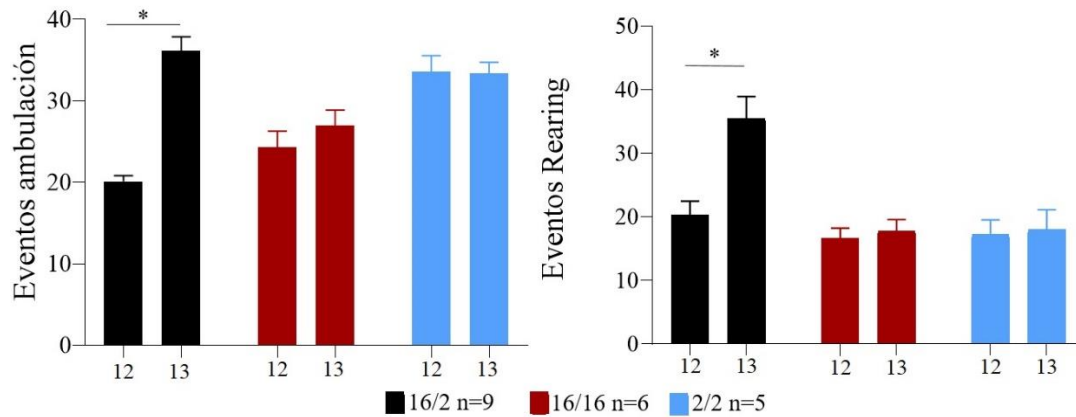


Figura 4.4. (a) Promedio de eventos de ambulaci3n por sesi3n. (b) Promedio de eventos de rearing por sesi3n. Grupo experimental: 16/2. Grupos controles 2/2 y 16/16.

Por 3ltimo, se contabiliz3 la cantidad de c3lulas positivas para c-Fos en las tres sub-3reas estipuladas de la CPFm: corteza cingulada anterior (ACC), corteza pre-l3mbica (PL) e infra-l3mbica (IL) (Figura 4.5). Un ANOVA de una v3a de los datos de la ACC indic3 diferencias significativas entre los grupos ($F_{(3,12)} = 3.870$, $p < 0.0379$). Las comparaciones m3ltiples indicaron diferencias significativas entre el Grupo 16/2 y el Grupo 2/2 ($p < 0.0116$) y el Grupo 16/2 y el Room ($p < 0.0146$). Haciendo un an3lisis para las otras dos regiones, la PL y la IL, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos (PL $p > 0.06$; y IL $p > 0.07$).

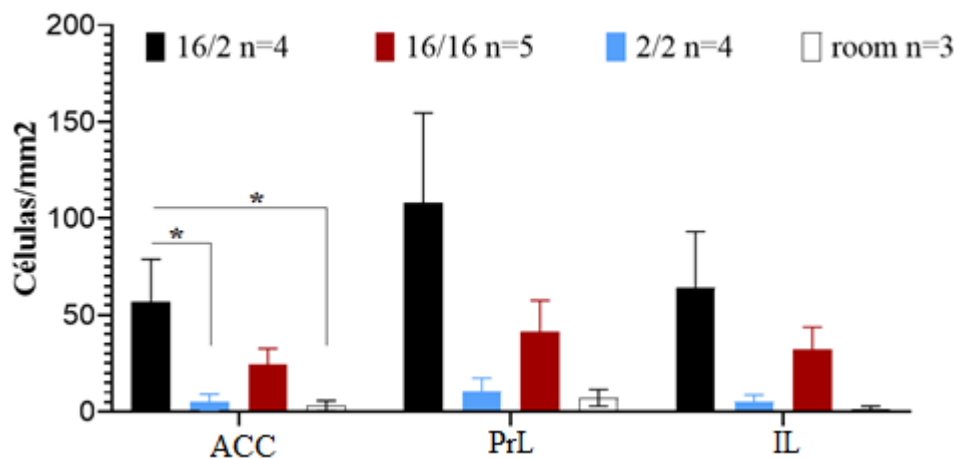


Figura 4.5. Densidad de células c-Fos positivas en cada una de las áreas analizadas. ACC: Corteza Cingulada. PrL: Corteza Pre-límbica. IL: Corteza Infra-límbica. Grupo experimental: 16/2. Grupos controles 2/2 y 16/16. "room": Grupo room control.

Discusión

Los resultados comportamentales replicaron la tendencia reportada en los Experimentos 6 y 7. Los sujetos del Grupo experimental 16/2, mostraron un cierto deterioro del desempeño en la primera sesión post-cambio, al igual que sucedió en los experimentos anteriores, pero no se logró diferenciar de ninguno de los grupos controles. Sin embargo, sí se observó un aumento de la ambulación y un aumento del *rearing* (del mismo modo que lo registrado en el Experimento 7). Como se detalló en el primer capítulo, el efecto de CNSi es un fenómeno anticipatorio, y sólo ocurre una vez que los animales ya experimentaron la devaluación del reforzador. Por este motivo, los sujetos en la primera sesión post-cambio difícilmente muestren un deterioro en el desempeño general (como sí sucedería en las sesiones posteriores, de haberse continuado el entrenamiento post-cambio). Las otras dos variables comportamentales registradas en este estudio, *rearing* y deambulación se registran junto con la administración del reforzador devaluado, por lo que presuntamente reflejan el estado del animal al momento de sufrir la devaluación. A diferencia del Experimento 7, en este caso se lograron detectar un aumento significativo tanto del *rearing* como de la deambulación entre etapas y entre grupos (es decir, el Grupo experimental 16/2 se diferencia de ambos controles).

Haciendo el análisis de la activación neural mediante inmunohistoquímica para c-Fos se detectó una actividad significativamente mayor de c-Fos en ACC para el grupo 16/2 en comparación al resto de los grupos. Las regiones PL e IL mostraron

una tendencia similar que no alcanzó a ser estadísticamente significativa. Es importante destacar que la ACC está implicada en el efecto de CNSi (e.g., Gurowitz et al., 1970), y también en una variedad de situaciones que involucran emociones negativas, como el dolor, el miedo, la exclusión social y el CNSc (De lima et al., 2022; Ortega et al., 2017; Xiao et al., 2021). En el estudio de Gurowitz et al. (1970), ratas cingulectomizadas por aspiración mostraron una disminución significativa de la supresión de la conducta en un corredor recto; es decir, en comparación con los controles *sham*, los animales lesionados mostraban un menor tiempo de recorrido luego de la devaluación. De manera contraria, la lesión de la ACC en el CNSc con soluciones azucaradas provoca un aumento en el efecto de supresión de la conducta; es decir, se retarda la recuperación de la respuesta.

En un aspecto complementario, la CPFm en general, y la ACC en particular, ha sido implicada en la detección de violaciones de expectativas; es decir, cuando hay errores en las predicciones de recompensa (e.g., Alexander et al., 2011). A su vez, como se describió previamente, la CPFm tiene conexiones sinápticas que resultarían claves para la expresión del fenómeno de contraste. En relación al circuito del refuerzo y la liberación de dopamina (DA), una de las regiones target de las neuronas dopaminérgicas de la ATV en la CPFm, es particularmente la corteza cingulada (Elston et al., 2019). En línea con esta predicción, Phelps et al. (2015) observaron una reducción del CNSi con la administración sistémica de anfetaminas (agonista dopaminérgico) y un incremento con la administración de alfa-Flupentixol (antagonista de receptores dopaminérgicos D2/D1). En cambio, se observó que la administración de haloperidol (antagonista dopaminérgico) no afecta la respuesta de CNSc (Flaherty et al., 1992). A su vez, como se mencionó anteriormente, las conexiones entre la CPFm y el NAc contribuyen a la liberación de dopamina, y existe una distinción en el efecto de la lesión del NAc en ambos paradigmas de CNS (Leszczuk & Flaherty, 2000). Por ejemplo, en el protocolo de CNSc se observó que la concentración de DA en el NAc aumentaba cuando se presentaba la solución 4% el primer día de post-cambio, tanto para los animales experimentales como para los controles. Sin embargo, el aumento de la concentración de DA era varias veces mayor para los animales de la condición 4/4 que para los de la condición 32/4 (Genn et al., 2004). Guarino et al. (2023) utilizaron la técnica de DREADDs para estimular o inhibir el NAc a lo largo de los 5 días posteriores a la devaluación del incentivo en un protocolo de CNSc. De acuerdo con lo esperado por los estudios de lesión, los

animales con inhibición no se diferenciaron de los controles. Así, estos resultados parecerían revelar una distinción en las bases neurales de ambos paradigmas en relación a la función dopaminérgica. Al respecto, es importante resaltar nuevamente (ya desarrollado en el Capítulo 3) que este neurotransmisor está ampliamente descrito por su rol en la codificación del refuerzo positivo en el cerebro, como también en los aspectos motivacionales del aprendizaje, sobre todo en tareas que requieren un costo relativamente mayor de esfuerzo, y esto podría explicar la diferencia entre paradigmas. Dado los resultados presentados, se podría resaltar la actividad de la ACC como clave para la modificación de estrategias comportamentales que ya no resultan efectivas, y esto podría estar mediado por sinapsis dopaminérgicas. Estas aferencias pertenecientes al circuito del refuerzo, podrían involucrar también las conexiones con otras estructuras de la vía meso-cortico-límbica y ser clave para la expresión del fenómeno de CNSi, pero no del CNSc.

Es importante tener en cuenta que los datos de c-Fos presentados aquí se registraron en animales que no dieron evidencia de CNSi, pero sí mostraron un efecto comportamental ante la devaluación de la recompensa en términos de aumento en la locomoción y el *rearing*, dos respuestas que también se describieron en experimentos de CNSc (Pellegrini & Mustaca, 2000). Al mismo tiempo, cabe destacar que los resultados aquí presentados son preliminares, dado que no se cuenta con el análisis de todos los cerebros extraídos en el Experimento 8. El hecho de contar con una muestra pequeña de cerebros afecta la potencia estadística (disminuyéndola); pero sin embargo, los efectos de activación de la ACC fueron significativos, lo que sugiere un tamaño de efecto grande. De esta manera, estos resultados parecen sugerir que la ACC y quizás también las demás sub-áreas de la corteza, responden al evento de reducción de la recompensa bajo condiciones de entrenamiento masivo (1) antes de que este evento se manifieste en el comportamiento instrumental del animal, pero (2) mientras los animales muestran evidencia de un efecto emocional en la caja de meta.

Con estos antecedentes, el próximo experimento tuvo como meta comenzar con el estudio de los circuitos implicados en la respuesta de CNSi, utilizando registros electrofisiológicos. En este caso, se realizó un protocolo instrumental usando como recompensa soluciones de sacarosa 32% y 4% (soluciones típicamente empleadas en procedimientos de CNSc). En particular, la tarea de CNSi se desarrolló con un paradigma de registros electrofisiológicos de “cabeza fija”, que ha sido

desarrollado y ampliamente utilizado en nuestro laboratorio por el grupo de Circuitos Neuronales, Cognición y Conducta, dirigido por el Dr. Silvano Zanutto (e.g., Mininni et al., 2017; Pereyra et al., 2021), pero que nunca se había aplicado al estudio del CNS.

Experimento 9: Registro electrofisiológico en la Corteza Pre-límbica en CNSi en un protocolo de cabeza fija con soluciones azucaradas como recompensa

Como se mencionó previamente, la idea de implementar el protocolo de “cabeza fija” en una situación de contraste, fue iniciar un tipo de registro en tiempo real que permitiera estudiar con mayor detalle funcional los circuitos neuronales implicados en la respuesta de frustración. Por otro lado, la puesta a punto de este nuevo protocolo, permitirá a futuro analizar la participación de otras áreas implicadas en el circuito neuronal subyacente. En este sentido, la metodología aplicada en este experimento (realizada en nuestro laboratorio en colaboración con el grupo del Dr. Silvano Zanutto), constituye el paso inicial para la aplicación sistemática de este protocolo de cabeza fija al estudio del CNS.

Materiales y métodos

Sujetos: se utilizaron ratas macho experimentalmente *naive* de la cepa Long Evans de 60 días, que se alojaron individualmente y tuvieron alimentación y bebida *ad libitum* hasta la cirugía. Los animales inicialmente pesaron entre 250 y 350 gramos (peso *ad libitum*). Fueron sometidos a un protocolo de *handling*, que consistió en acostumarlos a la sujeción y restricción de movimiento en las manos del investigador de manera paulatina. Esto se realizó para evitar lo máximo posible el estrés del cepo utilizado en el entrenamiento.

Cirugías:

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del IByME y fueron elaborados teniendo en cuenta las recomendaciones de la Directiva 2010/63/UE y de la *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (2010). Para todos los procedimientos quirúrgicos se utilizó un microscopio de cirugía Newton SRL, y material de cirugía previamente esterilizado con agua en solución iodada. Las ratas fueron anestesiadas

inicialmente con una dosis mezcla de ketamina (100 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg). El pelaje en la parte superior de la cabeza fue rasurado, y se inyectó 1 ml de lidocaína subcutáneamente como anestésico local en la zona donde luego se realizó la incisión con un bisturí. Durante el procedimiento se le aplicaron gotas de lágrimas en gel estériles en los ojos. Luego, se colocó a la rata en el esterotáxico, donde fue puesta sobre un soporte térmico y cubierta con una manta limpia. Dos punzones fueron introducidos, uno en cada uno de los orificios del oído de la rata, para sujetar la cabeza y evitar movimientos laterales. Se apoyaron los incisivos sobre el soporte móvil del esterotáxico, con el cual se ajustó la altura dorso-ventral correcta, y luego se presionó con una barra levemente entre los dientes y el hocico para evitar giros en este sentido. De esta manera, la cabeza quedó firme durante el período de la cirugía. Luego, se localizó la barra anterior de manera que el cráneo quede a la misma altura dorso-ventral. Se realizó una craneotomía con un torno sobre la coordenada de la CPFm: +2,7 mm anteroposterior y +0,5 mm lateral respecto del punto Bregma, de acuerdo con el atlas de Paxinos & Watson (2007). Luego, se colocó un cilindro plástico de aproximadamente 4 mm de diámetro y 4 mm de profundidad cubriendo la craneotomía realizada. Este cilindro se pegó directamente sobre la superficie del cráneo de forma de aislar la zona de registro para protegerla de futuras posibles infecciones y poder visualizarla mejor al momento de bajar el electrodo.

Posteriormente se colocó una pieza de aluminio en forma de cruz, de peso aproximado de 2 gramos, la cual funcionó como un implante que permitió fijar la cabeza del animal al marco esterotáxico durante las sesiones de registro. Se colocaron 4 tornillos pequeños en el cráneo y posteriormente se colocó la pieza metálica por encima y se vertió acrílico dental, dejándola fija al cráneo de la rata, y cubriendo la zona de registro con un protector plástico cilíndrico.

Inmediatamente posterior a la cirugía, la rata recibió una inyección subcutánea del analgésico Meloxicam (Mobic, Boehringer Ingelheim, AR) a una dosis de 1 mg/kg. Como parte de los cuidados post-operatorios las ratas fueron tratadas individualmente con antibióticos (0,05 mg/ml de Enrofloxacin; Floxacin, Afford, AR) y analgésicos (3 gotas de Tramadol 5% por 100 ml de agua; Calmador, Finadiet, AR) disueltos en agua corriente, y fueron alimentados libremente. Este tratamiento se extendió durante 5 a 7 días.

Aparato y Set Experimental:

En este experimento, los animales fueron entrenados en un paradigma de cabeza fija (Mininni et al., 2017; Pereyra et al., 2021). Para esto, utilizando los implantes previamente colocados en la cirugía se colocó a los sujetos en el estereotáxico, envueltos en un velcro, sobre un cepo fabricado de plástico, que impedía el movimiento de los sujetos en cualquier sentido (*Figura 4.6a y b*). Los implantes de aluminio eran adosados con tornillos y tuercas mariposas, a unas piezas de plástico talladas utilizando una fresadora que permitían la fijación de la cabeza al estereotáxico (*Figura 4.6c y d*). A su vez, se les acercó a los animales un pico conectado a una válvula controlada por computadora, que les proporcionaba una gota de solución.

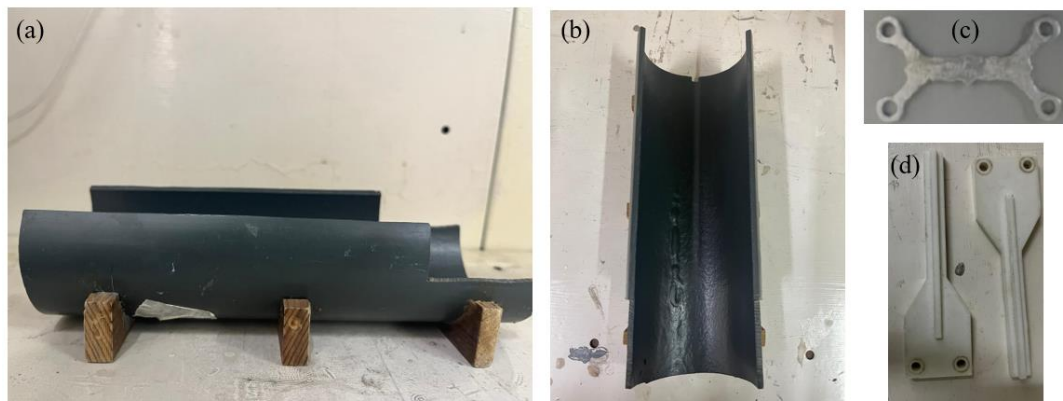


Figura 4.6. (a) y (b) Vista lateral y superior del cepo. (c) Implante que se coloca en la cabeza de los sujetos. (d) Piezas de plástico para la fijación de la cabeza al estereotáxico (se sujetan al implante usando tornillos y tuercas mariposas).

Electrodos:

Los electrodos para registro fueron manufacturados en el laboratorio (*Figura 4.7*) siguiendo el protocolo de Gray et al. (1995). Se utilizaron cables de níquel-cromo de 12 μm de diámetro (Kanthal Palm Coast, USA). Estos cables fueron cortados en secciones de 25 cm de longitud, fueron unidos de a pares por las puntas y sujetos por sus extremos a una pinza de metal. Luego fueron trenzados con la ayuda de un agitador al hacer girar la pinza de metal que sujetaba los extremos, a velocidad constante, obteniendo así un arreglo de tetrodo con 4 puntas. Este arreglo fue introducido en una cánula de acero inoxidable (de 250 μm de diámetro) para darle mayor rigidez al electrodo. Una cobertura de poliamida mantuvo aislados los cables

entre sí. Las trenzas de tetrodos fueron introducidas una por cánula, y luego las cánulas fueron pegadas entre sí con cianoacrilato, de esta manera quedaron distribuidos 4 canales de registro por cada cánula. Un cable de cobre fue sujeto y utilizado para poner a tierra las cánulas.



Figura 4.7 – Procedimiento para el armado de electrodos.

Entrenamiento con cabeza fija y toma de registros:

El protocolo de entrenamiento con cabeza fija ha sido ampliamente validado en nuestro laboratorio (Mininni et al., 2017; Pereyra et al., 2021). En el mismo, luego de la recuperación post-quirúrgica los sujetos fueron restringidos parcialmente de alimento hasta alcanzar el 85% de su peso *ad-libitum*. Una vez alcanzado este peso los sujetos estuvieron en condiciones de empezar el entrenamiento (ver resumen de las etapas del procedimiento experimental en la Figura 4.8).



Figura 4.8. Pasos del procedimiento experimental.

Procedimiento experimental:

El diseño experimental del Experimento 9 se muestra en la *Tabla 4.a*:

Tabla 4.a. Diseño Experimental de pre y post-cambio del Experimento 9.

	Pre-cambio (10 sesiones)	Post-cambio (5 sesiones)
Experimental 32/4 (n=4)	32% P/P	4% P/P
Control 4/4 (n=4)	4% P/P	4% P/P

Los animales fueron sometidos a 4 etapas de entrenamiento:

- **Habitación:** Los sujetos fueron expuestos al dispositivo experimental para habituarse a la situación de experimento. Para esto, se les permitió recorrer libremente el espacio durante 10 minutos y se les presentó el pico por el que recibieron la recompensa. Esta etapa consistió en un solo ensayo diario.
- **Habitación (restringido):** Durante esta etapa, los sujetos fueron expuestos al dispositivo de sujeción (cepo) y se les mantuvo la cabeza fija de la misma forma en la que fueron posteriormente entrenados, durante 15 minutos. Esta etapa también consistió en un solo ensayo diario.
- **Etapas pre-entrenamiento restringido + condicionamiento clásico:** Durante esta etapa, los sujetos fueron expuestos a un entrenamiento de condicionamiento clásico (*Figura 4.9*). Para esto se distribuyeron en 2 grupos: control (siempre recibía solución de 4% sacarosa) y experimental (recibió durante la etapa pre-cambio una solución de 32% sacarosa que fue degradada en la etapa post-cambio a 4%). Para ambos casos el protocolo se basaba en la aparición de un tono, que era seguido de una ventana temporal variable de 1 o 2 segundos y luego se liberaba una gota de la recompensa correspondiente a cada grupo. El programa especializado que controla la aparición de la recompensa se basa en el uso de una cámara que graba el hocico del animal, y detecta el cambio de píxeles cuando el sujeto saca la lengua. En el caso de esta etapa, los sujetos siempre recibieron una gota de solución luego del tono, para condicionar la respuesta instrumental. Este ensayo fue repetido 100 veces en una única sesión, con un intervalo inter-trial (ITI) de 4 segundos.

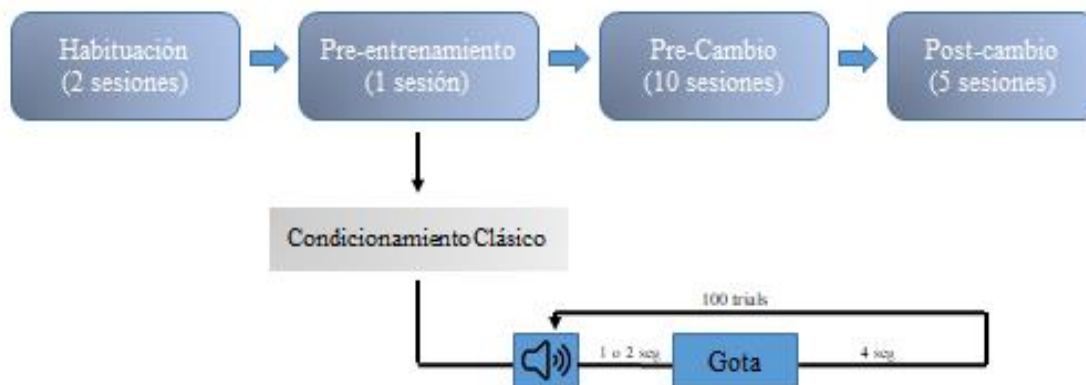


Figura 4.9. Diagrama del Pre-entrenamiento restringido y Condicionamiento Clásico.

- Etapa pre y post-cambio (condicionamiento operante):** Para esta etapa, se utilizó un protocolo de condicionamiento operante (Figura 4.10). En este caso, los sujetos tuvieron que ejecutar la respuesta de sacar la lengua para obtener la recompensa correspondiente a su grupo. Tanto en la etapa pre-cambio como post-cambio el procedimiento experimental fue igual: comenzaba con la aparición de un tono, que era seguido de una ventana temporal de 2 segundos en la que los sujetos debían ejecutar la respuesta. Si esta respuesta era positiva, se liberaba la gota de solución correspondiente, si no se ejecutaba no había recompensa. Este ensayo se repetía 100 veces por sesión con un intervalo inter trial era de 4 segundos. La etapa pre-cambio duró 10 sesiones (de 100 ensayos c/u), mientras que la etapa post-cambio fue de 5 sesiones (también de 100 ensayos c/u).

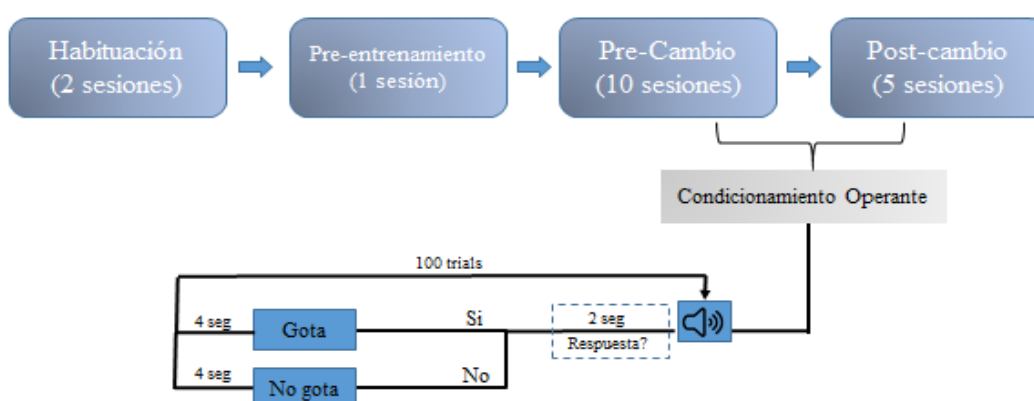


Figura 4.10. Diagrama del Pre y Post-cambio (Condicionamiento Operante).

Toma de registros: Las variables comportamentales medidas fueron el tiempo de respuesta y el número de respuestas correctas (es decir, cantidad de veces que los

animales ejecutaron correctamente en la ventana temporal la respuesta de sacar la lengua). A su vez, se tomaron registros electrofisiológicos utilizando los electrodos de 12 canales citados previamente en las sesiones 8 a 14. Para esto, previo al inicio de cada sesión se removió el algodón colocado en las craneotomías y se administró 1 ml de lidocaína al 2% como anestésico local, una vez que el sujeto ya estaba colocado en el cepo. Posteriormente, usando la lupa se ingresó el electrodo con la ayuda de un micromanipulador a una velocidad de aproximadamente 10-20 μ m/s, hasta encontrar actividad neuronal en las coordenadas pre-establecidas. Los electrodos fueron conectados a un pre-amplificador (ganancia x10) y finalmente al amplificador (ganancia x1000), esta señal fue registrada en una computadora que adquiriría los datos a una tasa de muestro de 30kHz. Al terminar la sesión, se retiraba el electrodo. Así, los electrodos fueron colocados y extraídos en cada sesión.

Los análisis y las pruebas estadísticas de los datos registrados fueron implementados en MATLAB (The MathWorks Inc., USA). El primer paso consistió en la identificación de las unidades neuronales en base a características de la forma de los potenciales de acción. Las muestras obtenidas de registros se procesaron utilizando un *sorter* denominado UltraMegaSort2000 (*Figura 4.11*), desarrollado por el laboratorio de Neurofísica de la Universidad de California en San Diego (USA). En primer lugar, el set de datos fue separado en *miniclusters* utilizando algoritmos de tipo K-means. Estos *miniclusters* fueron agregados entre ellos de acuerdo a su energía de interfase (Fee, 1996). Los *cluster* formados fueron inspeccionados manualmente para agruparlos o separarlos de acuerdo a la distribución de sus formas de onda en gráficos de componentes principales. El análisis de componentes principales es uno de los métodos más utilizados de extracción (Abeles & Goldstein 1977; Rossant et al., 2016). Fueron incluidas en el análisis posterior solamente las unidades con una señal 4 veces mayor al ruido basal. Esto fue calculado como la proporción entre el valor de potencial promedio de los disparos de la neurona, alineados en sus picos, y el desvío estándar de la señal 1 milisegundo antes. Las neuronas que cumplieron con este requisito fueron clasificadas como piramidales putativas o interneuronas de acuerdo a parámetros de su forma de onda promedio, como ser la duración de su amplitud media y el tiempo transcurrido entre el mínimo y el siguiente pico (Bartho et al., 2004).

Se identificaron unidades neuronales en base a características de la forma de los potenciales de acción, y en base a todas las unidades encontradas se construyó un

raster para cada neurona para cada sesión conteniendo los tiempos de disparo. Para esto, con una resolución de 1 ms, se computó con 1 y 0 los eventos de disparo de cada unidad a lo largo del tiempo para cada ensayo (o *trial*). Posteriormente, se alinearon todos los ensayos correspondientes a cada unidad, y por cada sesión, y se construyó un histograma de tiempos peri-estímulo (donde se tomó como tiempo “0” el inicio del tono) (PSTH). Dichos PSTHs son matrices en las cuales cada fila corresponde a un ensayo, y cada columna es un milisegundo del tiempo de la tarea, donde hay un 0 si no ocurrió un evento de disparo en dicho ms, o un 1 si ocurrió un evento de disparo. Cada ensayo está alineado con los demás en el inicio del tono (tiempo = 0 ms). Como cada ensayo es una repetición de una secuencia de estímulos, utilizando los PSTHs se puede promediar a lo largo de los ensayos cuál es la respuesta de las neuronas, y si hay cambios dinámicos tomando ventanas de tiempo consecutivas. A partir de esta información se realizaron los análisis posteriores. A su vez, para algunos análisis se utilizó el z-score, para lo cual se restó a cada ensayo el valor promedio de disparo en una ventana inmediatamente anterior al inicio del tono, y se los dividió por su desvío estándar a lo largo de los ensayos (ver desarrollo en la siguiente fórmula):

$$Zscore_i = \frac{\bar{x}_i - \bar{x}_{-200ms \text{ a } 0ms}}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

Siendo $\bar{x}_i$, el promedio de tasa de disparo para cada ventana de tiempo de 200ms, $\bar{x}$ el promedio de la tasa de disparo en la ventana de tiempo previa al comienzo del tono (de -200ms a 0ms), s el desvío estándar de la muestra y n la cantidad de ensayos (100).

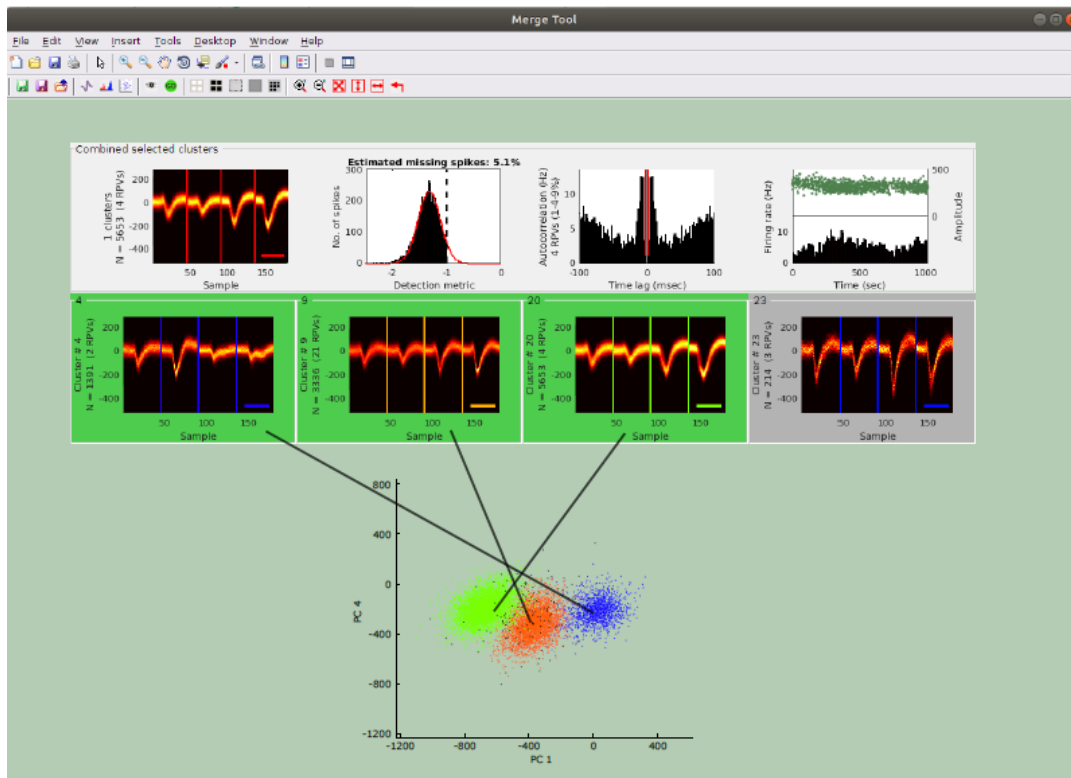


Figura 4.11. Análisis offline de los registros utilizando el sorter UltraMegaSort2000. Los spikes fueron agrupados en clusters de acuerdo a sus formas de onda. Los clusters seleccionados en color verde (arriba) pueden separarse por su forma de onda promedio y por la distribución espacial de sus unidades en los componentes principales (abajo). La última población fue descartada porque no cumplía el criterio de ser asignada a ningún cluster a través del método de componentes principales.

Resultados:

Resultados Comportamentales:

Porcentaje de Respuestas correctas:

Se cuantificó la cantidad de respuestas correctas y se las expresó en porcentaje respecto al total de ensayos por cada sesión de entrenamiento. Se cuenta como “respuesta correcta” a aquellos ensayos en los que el sujeto sacaba la lengua en la ventana de tiempo correspondiente y obtenía de esta forma el refuerzo correspondiente a su grupo. En la *Figura 4.12a* se observa el porcentaje de respuestas correctas promedio para cada grupo por sesión. La línea punteada representa la devaluación de la recompensa, separando la última sesión pre-cambio (sesión 10) de la primera sesión post-cambio (sesión 11).

Un ANOVA de medidas repetidas de los datos de la etapa pre-cambio para los factores Sesión y Grupo indicó un efecto significativo sólo en Grupo ($F_{(1, 6)} = 22.13$, $p < 0.0033$). Para el caso del post-cambio, no se encontraron efectos significativos de ninguno de los factores ($ps > 0.4$). Las comparaciones múltiples utilizando el método de LSD Fisher arrojaron diferencias significativas entre grupos para todas las

sesiones pre-cambio, excepto la tercera sesión. Mientras que no se obtuvieron diferencias significativas entre grupos en las sesiones post-cambio ($F = 8.056$, $p > 1.796\text{e-}09$).

Tiempo de respuesta:

En la *Figura 4.12b* se representan los promedios de tiempos de respuesta, es decir, el promedio del tiempo que demora el animal en responder en cada sesión dentro de la ventana de oportunidad de 2 segundos. En los ensayos donde el animal no respondió se consideró el tiempo de respuesta como el total de la ventana de oportunidad. Un ANOVA de medidas repetidas de Sesión x Grupo para la etapa pre-cambio indicó únicamente un efecto significativo del factor Grupo ($F_{(1,6)} = 16.78$, $p < 0.0064$). Para el caso de la etapa post-cambio, un ANOVA de medidas repetidas no logró detectar un efecto significativo de ninguno de los factores ($ps > 0.1$).

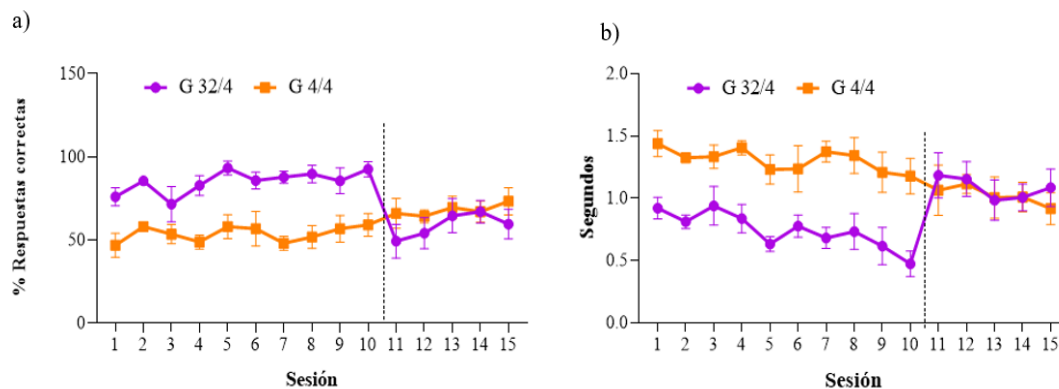


Figura 4.12. Resultados comportamentales. (a) Porcentaje de respuestas correctas. (b) Tiempo de respuesta. Grupo experimental: 32/4. Grupo control 4/4.

Durante los entrenamientos, sistemáticamente se observó que los sujetos del grupo experimental en la sesión 11 respondían más en el comienzo de dicha sesión que al final. Esto indicaría que los animales demoran en suprimir la respuesta luego de la devaluación. Por este motivo se dividieron las sesiones en bloques de 50 ensayos y se repitió el análisis (*Figura 4.13*).

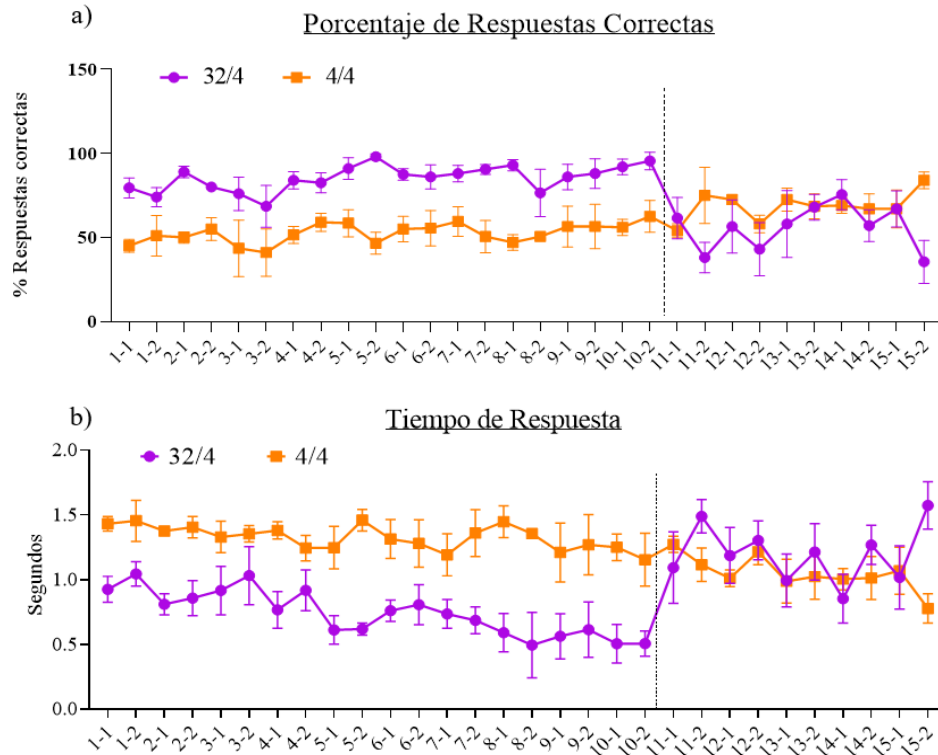


Figura 4.13 – (a) Porcentaje de respuestas correctas en cada mitad de cada sesión (bloques de 50 ensayos). (b) Tiempo de respuesta en cada mitad de cada sesión. Grupo experimental: 16/2. Grupos controles 2/2 y 16/16.

Se realizó un ANOVA de medidas repetidas para las sesiones post-cambio, para ambas variables comportamentales, que arrojó para el Porcentaje de respuestas correctas un efecto significativo de la interacción Sesión x Grupo ($F_{(11,66)} = 6.180$, $p < 0.0001$). Las comparaciones posteriores indicaron, para el grupo experimental, que existían diferencias significativas entre el primer y el segundo bloque de ensayos de la sesión 11 ($p < 0.0342$) y la sesión 15 ($p < 0.02$). Las demás sesiones no mostraron diferencias significativas entre la primera y segunda mitad. Para el caso del grupo control, se observaron diferencias significativas entre la primera mitad de la sesión 12 y la segunda mitad ($p < 0.0150$). A su vez, se encontraron diferencias significativas entre los grupos para el segundo bloque de ensayos de la sesión 11 ($p < 0.0443$) y para el segundo bloque de la sesión 15 ($p < 0.03$) (Figura 4.13).

Para el caso del tiempo de respuesta, el mismo análisis arrojó un efecto de la interacción Sesión x Grupo ($F_{(9,54)} = 4.003$, $p < 0.0006$). Los contrastes no detectaron diferencias significativas entre bloques de ensayos en ninguna de las sesiones ($ps >$

0.05). A su vez, sólo se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la sesión 15-2 ($p < 0.0138$).

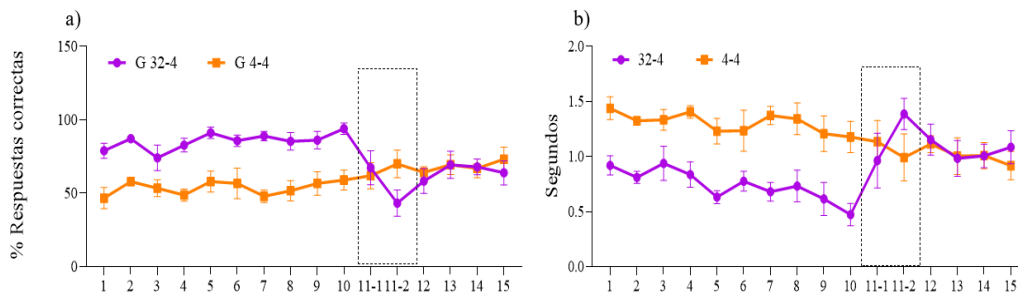


Figura 4.14. (a) Porcentaje Respuestas correctas incluyendo la sesión 11 dividida en dos mitades (bloques de 50 ensayos). (b) Tiempo de respuesta incluyendo la sesión 11 dividida en dos mitades. Grupo experimental: 16/2. Grupos controles 2/2 y 16/16.

Resultados Registros Electrofisiológicos:

Se analizaron los registros electrofisiológicos de 3 sujetos experimentales y 2 sujetos control. Se obtuvieron registros de las sesiones 8, 9 y 10 (pre-cambio), y 11, 12, 13 y 14 (post-cambio). Una vez obtenidas las unidades neuronales, se procedió a caracterizarlas como neuronas piramidales putativas o interneuronas, de acuerdo a características de las formas de onda promedio. La metodología de caracterización fue obtenida del estudio de Barthó et al. (2004), y utiliza como parámetros: el tiempo entre el mínimo y el máximo posterior, y el ancho del pico de la onda. Las interneuronas que presentaban valores más bajos de ambos parámetros no se utilizaron en los análisis posteriores (Figura 4.15). En total, se registraron 263 neuronas de la corteza prefrontal (170 de sujetos experimentales y 93 de sujetos control). De todas estas se pudieron caracterizar 137 como piramidales putativas y 91 como interneuronas. La *Tabla 4.b* muestra la cantidad de neuronas piramidales de CPF registradas por sesión y para cada grupo.

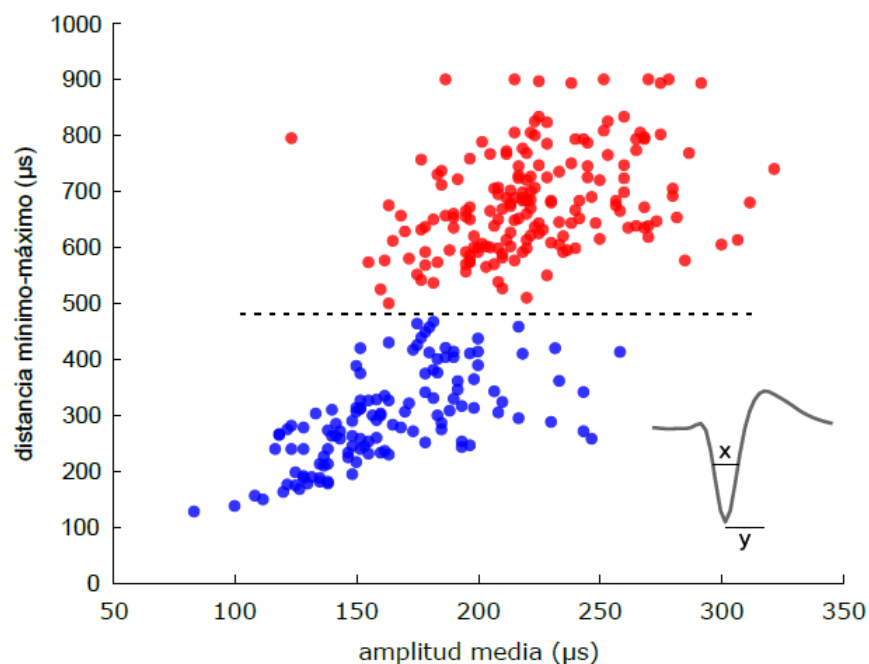


Figura 4.15 – Caracterización de unidades neuronales según el método explicado publicado en Barthó et al (2004). Los puntos rojos representan las neuronas piramidales putativas, mientras que los puntos azules representan las interneuronas. El umbral utilizado para separar las poblaciones neuronales fue de 480ms.

Tabla 4.b. Cantidad de neuronas piramidales registradas para cada sesión y para cada grupo.

	Experimental (3 animales)	Control (2 animales)
Sesión 8	n=11	n=15
Sesión 9	n=11	n=11
Sesión 10	n=11	n=13
Sesión 11	n=10	n=7
Sesión 12	n=9	n=8
Sesión 13	n=15	n=5
Sesión 14	n=8	n=3

En primer lugar, se calculó la tasa de disparos promedio de cada neurona. La Figura 4.15 muestra la tasa de disparos promedio por sesión de cada neurona, expresado en disparos por segundo (Hz). La tasa de disparo promedio de todas las neuronas por sesión da una medida de la actividad general del área. La Tabla 4.c muestra la frecuencia media de disparo para cada sesión (Hz $\pm$ errores estándares). Se realizó un análisis de modelos mixtos para estos datos, para la interacción Sesión

x Grupo que indicó que no hay efectos significativos de ninguno de los factores ($ps > 0.06$).

Tabla 4.c. Tasa de disparo promedio y SEM (en Hz) de las neuronas piramidales registradas para cada sesión y para cada grupo.

	Sesión 8	Sesión 9	Sesión 10	Sesión 11	Sesión 12	Sesión 13	Sesión 14
Experimental	3.1 ± 0.6	2.9 ± 0.6	1.8 ± 0.4	3.6 ± 0.6	6.3 ± 1.3	2.7 ± 0.5	2.2 ± 0.4
Control	4.1 ± 1.2	3.1 ± 0.5	4.4 ± 1.1	3.0 ± 0.4	3.3 ± 1.3	3.6 ± 1.1	2.8 ± 1.3

Tomando los valores individuales de la tasa de disparos promedio de cada neurona durante la ventana del tono (*Figura 4.16*), se realizó un análisis de modelos mixtos para los factores Sesión y Grupo. Este análisis mostró que no hay efectos significativos de ninguno de los dos factores ($ps > 0.09$). Teniendo esto en cuenta, se propuso analizar si existían diferencias en las sesiones 11 y 12 en comparación con la última sesión pre-cambio. Para esto se realizaron comparaciones mediante el test no paramétrico de U de Mann-Whitney para muestras independientes. Se detectaron diferencias significativas entre las neuronas de la sesión 10 y la 12 ($p < 0.0024$) en la condición experimental. Para el caso del grupo control, no se encontraron diferencias entre las mismas sesiones ($ps > 0.5$). A su vez, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos para ninguna de las sesiones ($ps > 0.5$).

Tasa de disparo en la ventana del tono

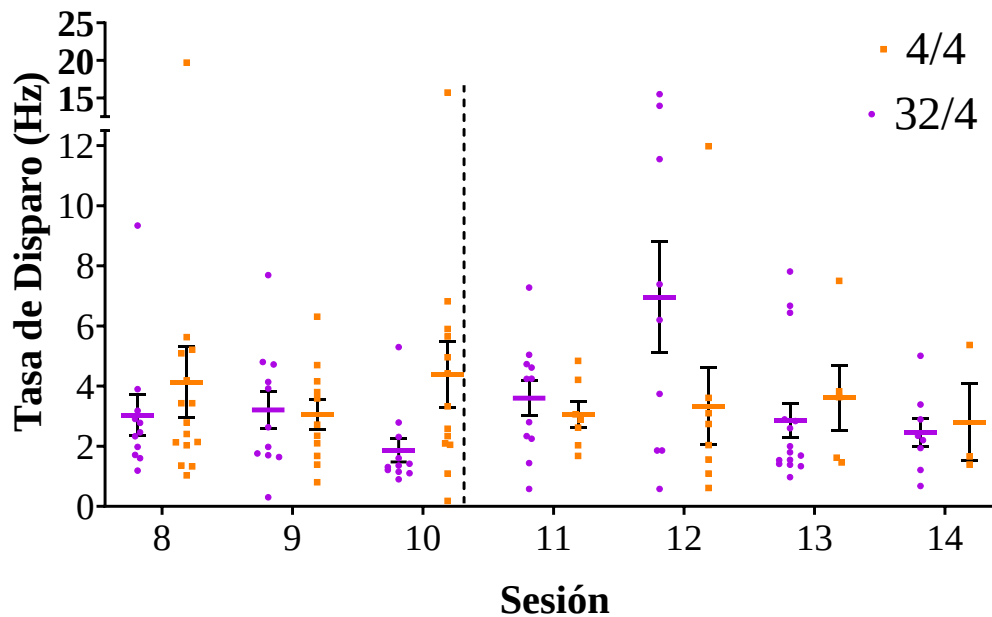


Figura 4.16. Tasa de disparo promedio en la ventana del tono (1000 ms) en cada sesión para ambos grupos. Cada valor individual corresponde a la tasa promedio de disparos de una neurona a lo largo de una sesión. Grupo experimental: 16/2. Grupos controles 2/2 y 16/16.

Posteriormente, se procedió a analizar la actividad neuronal en relación a los tiempos de ejecución de la tarea. Para cada neurona se confeccionó un histograma peri-estímulo. Este tipo de análisis permite observar si una neurona se activa consistentemente a lo largo de los ensayos en algún tiempo específico del procedimiento de condicionamiento operante. Por esta razón, se utilizará una ventana de tiempo de 200 ms, para poder observar los cambios dinámicos en la actividad de las neuronas en relación al estímulo (tono) y la recompensa. La Figura 4.17 muestra el promedio de la actividad de las neuronas, normalizada a una ventana de 200 ms inmediatamente anterior al inicio del tono (*z-score*). La utilización de esta normalización permite definir si las neuronas registradas presentan un cambio de comportamiento en relación a su propia actividad basal (lo cual permitiría entender si los cambios observados son producto de la presentación de los estímulos, más allá de la actividad característica de cada neurona). Se observa en este caso, que existe una alta variabilidad en ambos grupos en la actividad de las neuronas registradas, y no parece haber un patrón de respuesta diferencial en algún momento del entrenamiento que diferencie a los grupos.

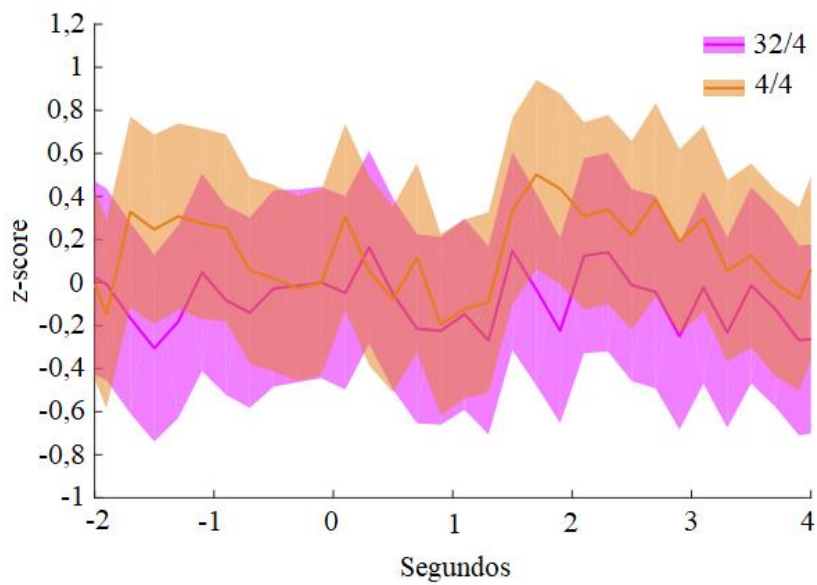


Figura 4.17. Z-score promedio de todas las neuronas registradas para ambos grupos: 32/4 ($n = 75$), y 4/4 ($n = 62$). El tiempo 0 corresponde al inicio del tono. Grupo experimental: 16/2. Grupos controles 2/2 y 16/16.

Tomando en cuenta la *Figura 4.17*, se presentan los datos de los z-score promedio por sesión y por grupo, para analizar la actividad de las neuronas en relación al comportamiento de los sujetos (*Figura 4.18* grupo experimental y *Figura 4.19* grupo control).

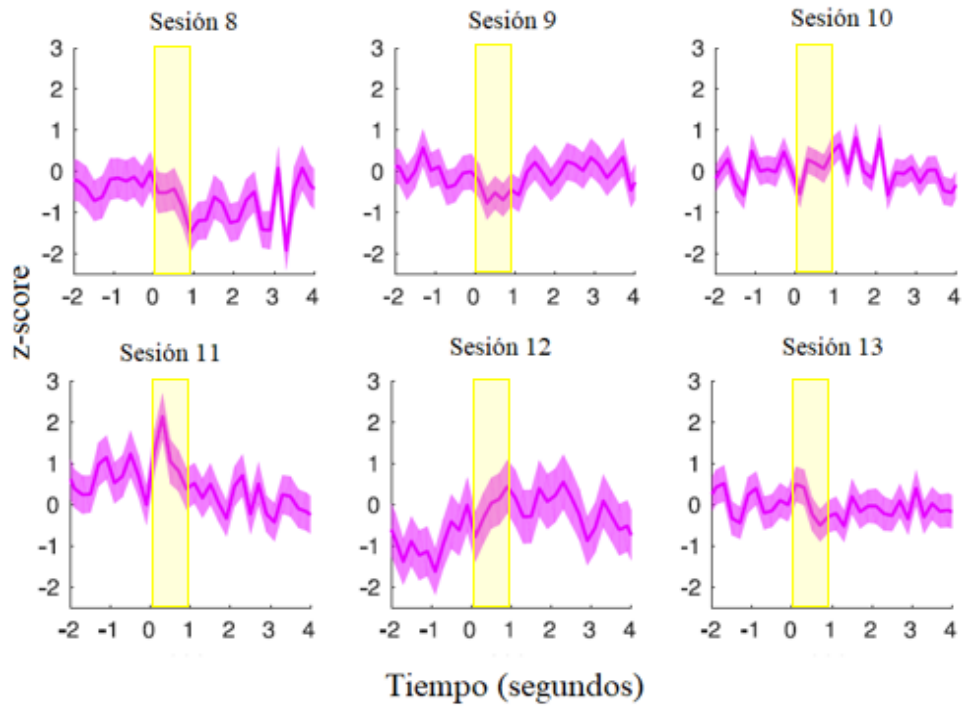


Figura 4.18. Z-score promedio para cada sesión de las neuronas registradas del grupo experimental 32/4. El tiempo 0 representa el inicio del tono. El rectángulo amarillo señala el tiempo de tono.

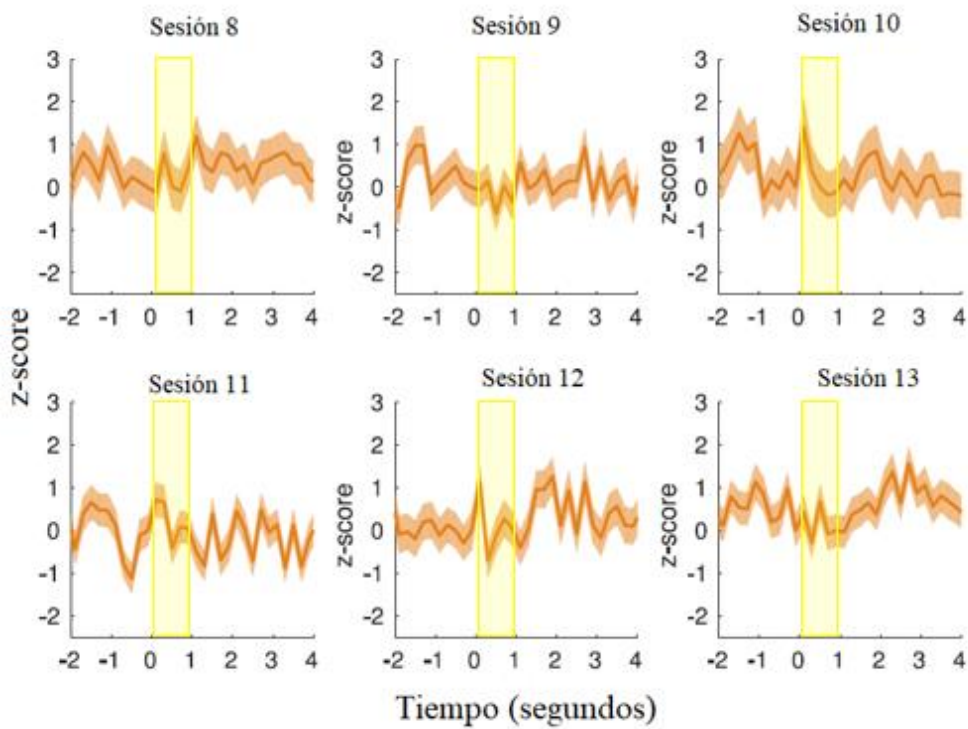


Figura 4.19. Z-score promedio para cada sesión de las neuronas registradas del grupo control 4/4. El tiempo 0 representa el inicio del tono. El rectángulo amarillo señala el tiempo de tono.

En la *Figura 4.18* puede observarse en el grupo experimental un aumento relativo repentino en la actividad durante la presentación del tono en las neuronas registradas en la sesión 11, lo cual no se observa con claridad en las demás sesiones, y tampoco el grupo control. Teniendo en cuenta esto, se procedió a caracterizar unidades neuronales que tuvieron un comportamiento diferencial en relación a los estímulos. De esta manera, se identificaron neuronas en ambos grupos que presentaron individualmente un aumento o disminución de la tasa de disparo durante la presentación del tono en comparación con la actividad basal. Para esto se elaboró una matriz conteniendo los valores normalizados de la tasa de disparo a lo largo del tiempo (*z-score*) en ventanas de 200 ms. Con esto se hicieron comparaciones entre la ventana basal y la ventana del tono para cada neurona, lo que permitió caracterizar aquellas neuronas que se activaron (aumentando su tasa de disparo significativamente) y cuales se inhibieron (disminuyendo su tasa de disparo). Para comprobar esto se compararon en los *z-score* ventanas de 200 ms posteriores al inicio del tono con la ventana ‘basal’, la cual corresponde a los tiempos -200 a 0 ms, utilizando la Prueba de suma de rangos de Wilcoxon (e.g., Mininni, et al., 2017; Morton et al., 2024; Wallis & Miller, 2003). Las neuronas que mostraron una diferencia estadísticamente significativa y también un aumento relativo mayor a 3 veces a la actividad basal en algún intervalo dentro del tiempo del tono, fueron consideradas neuronas que se “activan” en el tono. De forma análoga, fueron clasificadas las neuronas que se “inhiben” en el tono. Esta información está resumida en la *Tabla 4.d*.

Tabla 4.d. Neuronas que se activan o se inhiben significativamente en comparación a su respuesta basal, para cada sesión. Se expresa también el porcentaje en relación al total de neuronas registradas.

	Experimental 32/4				Control 4/4			
	Activan	%	Inhiben	%	Activan	%	Inhiben	%
Sesión 8	0	0.0	2	18.2	2	13.3	1	6.7
Sesión 9	0	0.0	1	9.1	0	0.0	0	0.0
Sesión 10	3	27.3	1	9.1	0	0.0	0	0.0
Sesión 11	4	40.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Sesión 12	0	0.0	1	11.1	0	0.0	0	0.0
Sesión 13	1	6.7	2	13.3	0	0.0	0	0.0
Sesión 14	1	12.5	1	12.5	0	0.0	0	0.0

Se puede observar que en el grupo control el porcentaje de neuronas que se “activan” o “inhiben” durante el tono fue más bajo.

Considerando estos resultados, se calculó la tasa de disparos promedio a lo largo de los ensayos para todas las neuronas tomando sólo el intervalo de tiempo en el que las neuronas alcanzan el máximo valor en la sesión 11 dentro del tono (de 200 a 400 ms después del inicio del mismo). Estos resultados se normalizaron utilizando el *z-score* y se analizaron utilizando un análisis de modelos mixtos de Sesión x Grupo. La *Figura 4.20* muestra los resultados por sesión para cada grupo. Se encontró un efecto significativo de la interacción Sesión x Grupo ($F_{(5,100)} = 2.897$, $p < 0.0175$). Los contrastes múltiples indicaron diferencias significativas entre los grupos en la sesión 11 ($p < 0.0311$). Esto parece indicar que, en esta ventana de tiempo, las neuronas piramidales putativas de la CPFm del grupo experimental aumentan su tasa de disparo en la primera sesión post-cambio.

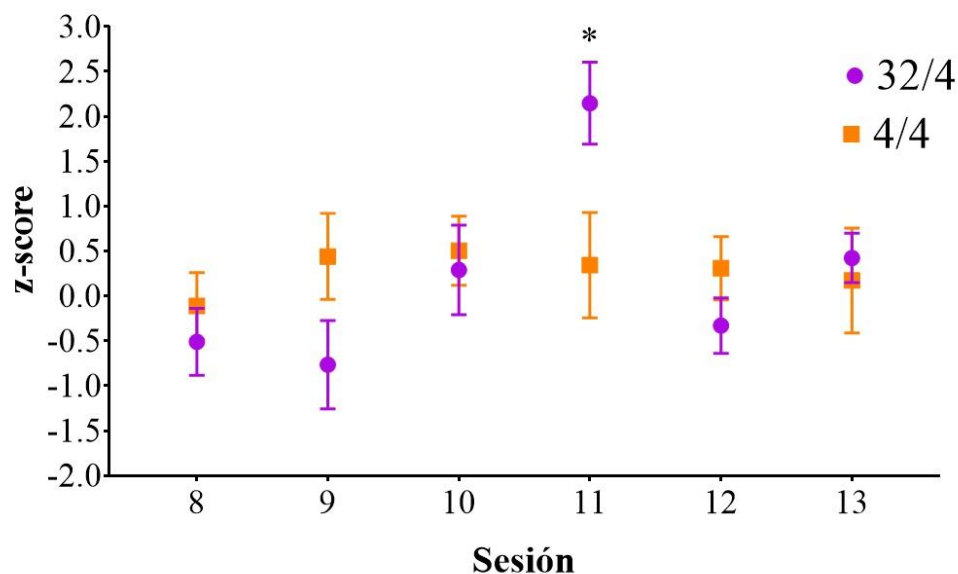


Figura 4.20. Z-score promedio de todas las neuronas registradas en la ventana de tiempo de 200-400 ms en cada sesión para ambos grupos. Grupo experimental: 32/4. Grupo control: 4/4.

Finalmente, se muestran como ejemplos de las neuronas que se “activan” durante el tono de la sesión 11. En dicha sesión hay mayor cantidad de ensayos donde el animal no responde (*Figura 4.12a*). En relación a esto, se promedió la actividad neuronal a lo largo de los ensayos en los que el sujeto responde y en los que no

responde. Interesantemente en un mismo registro encontramos una neurona que se “activa” en el tono indistintamente a si ocurre respuesta o no, mientras que otra neurona se “activa” en el tono preferentemente si el animal va a ejecutar la respuesta (Figura 4.21). Se puede observar como parece haber un alineamiento de los disparos en el momento del tono, para ambas neuronas graficadas. A su vez, se procedió a constatar si la tasa de disparo variaba significativamente para los ensayos en los que la rata respondía correctamente vs. aquellos en los que no. Para el caso de la neurona “66” (Figura 4.21a) se encontraron diferencias significativas en la tasa de disparo promedio en la ventana del tono ($p < 0.01$) entre los ensayos de respuestas correctas vs incorrectas. Para el caso de la neurona “64” (Figura 4.21b), no se encontraron diferencias significativas ($ps > 0.9$). Esto parece indicar que hay neuronas que responden diferencialmente si el animal va a ejecutar una respuesta instrumental.

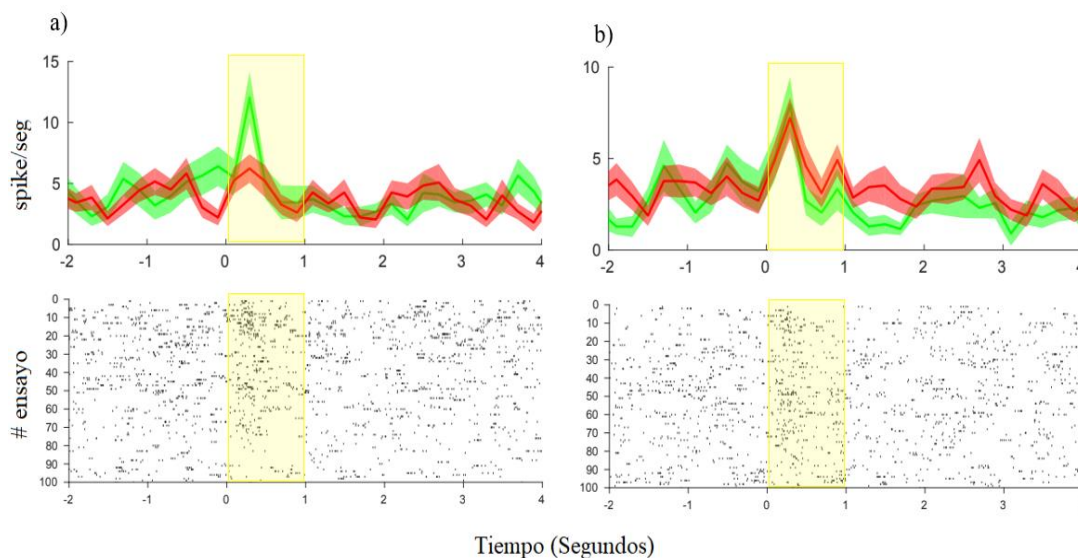


Figura 4.21. Ejemplos de neuronas (a y b) que se activan significativamente en la sesión 11. Se grafican los disparos por segundo para cada neurona en rojo los ensayos en los que el animal no respondió y en verde cuando si respondió. A su vez, se grafican los PSTH de las mismas neuronas. En ambos casos el tiempo 0 representa el inicio del tono y el rectángulo amarillo representa la ventana del tono.

Discusión:

Los resultados presentados en este último experimento resultan ser un puntapié inicial para el estudio del circuito neuronal de la frustración en la corteza pre-frontal. Tal como se planteó en el comienzo del capítulo, la actividad de la corteza pre-frontal parecería ser fundamental para la expresión del fenómeno de CNS, por lo que los

registros electrofisiológicos resultan ser una herramienta muy útil para tratar de comprender qué patrón de respuesta tiene esta estructura en consecuencia a la devaluación sorpresiva de una recompensa.

Los resultados comportamentales, mostraron una tendencia que parece representar un efecto de CNSi en la variable de porcentaje de respuestas correctas, aunque no se detectaron diferencias significativas entre los grupos. El tamaño de muestra aún es pequeño, por lo que la potencia de los tests puede no ser suficiente para expresar un efecto robusto. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre la primera mitad y la segunda mitad de la primera sesión post-cambio, lo que podría estar indicando que los sujetos no suprimen inmediatamente la respuesta. De manera interesante, este experimento parece indicar que estos parámetros resultan suficientes para el estudio del fenómeno de contraste. La cantidad de sesiones pre y post-cambio son las típicamente utilizadas en el paradigma de CNSc, al igual que la recompensa de soluciones azucaradas. En este caso, los sujetos debían ejecutar una respuesta para obtener el refuerzo, lo que vuelve a este paradigma uno instrumental u operante. Estudios previos habían fallado en encontrar un efecto de CNSi en un corredor recto utilizando soluciones azucaradas. En este caso, la tarea instrumental parece ser menos costosa y los sujetos logran adquirir una respuesta consistente a lo largo de las sesiones que luego es suprimida en la etapa post-cambio. De esta manera, es sumamente interesante para un futuro haber encontrado parámetros suficientes para estudiar este fenómeno paradójico utilizando un protocolo de cabeza fija, lo que permitirá avanzar en el conocimiento de sus bases neurofisiológicas.

Para el caso de los registros electrofisiológicos, la cantidad de neuronas registradas es muy pequeña como para encontrar resultados con relevancia estadística. A su vez, al ser un estudio preliminar, se realizó una batería de análisis que permitió encontrar el momento de la sesión de entrenamiento en el que se observa el efecto diferencial del grupo experimental. Sin embargo, haciendo promedios generales de tasa de disparo, se pueden observar diferencias significativas entre la sesión 10 (última pre-cambio) y la 12 (segunda post-cambio) en el grupo experimental, lo cual indicaría una mayor actividad de las neuronas registradas en la sesión 12. De manera interesante, las tasas de disparo del grupo experimental parecen responder de manera diferencial en relación al estímulo (tono) en la última sesión pre-cambio comparada a la primera post-cambio, lo que podría indicar un cambio en

el patrón de respuesta en consecuencia a la nueva recompensa. Este efecto se observa particularmente entre los 200 y 400 milisegundos después del inicio del tono. A su vez, se encontró que existe un mayor número de neuronas que se activan en la sesión 11 en la ventana del tono, y este resultado no se replica para el grupo control.

Las células de la CPFm se pueden dividir en excitatorias o inhibitorias. Las excitatorias son las más abundantes (aprox. 75%) y son del tipo glutamatérgicas. Dentro del grupo mayoritario podemos encontrar a las neuronas piramidales (grupo más abundante) y las estrelladas. Las neuronas piramidales putativas, como las registradas en este experimento, han sido ampliamente caracterizadas por sus conexiones con otras áreas, y dentro de la misma corteza, y por su participación tan diversa en distintos circuitos con funciones distintas. Por ejemplo, estas neuronas y la CPF en general, son altamente sensibles a la modulación de neurotransmisores como puede ser la dopamina. Incluso, se ha documentado que la interacción entre neuronas dopaminérgicas de la VTA con neuronas piramidales de la CPFm provocan una co-liberación de dopamina y de glutamato en la CPFm (Perez-Lopez et al., 2018; Ellwood et al., 2017). Como se describió anteriormente, la dopamina es un neurotransmisor que parece ser clave en el fenómeno de CNS, y se ha reportado que su modulación afecta la aparición de la respuesta de frustración (Phelps et al., 2015). Las neuronas registradas y analizadas en este experimento, fueron potencialmente piramidales glutamatérgicas, por lo que son candidatas de mostrar diferencias en su actividad luego de la devaluación del refuerzo. Se necesitan más réplicas para ahondar en esta hipótesis, y se plantea registrar con este mismo protocolo la actividad de VTA.

En conclusión, los datos hasta ahora parecen ir en línea con la idea de que la CPFm tiene un papel importante en el fenómeno de CNSi, ya que los sujetos experimentales que expresan una supresión de la conducta, también muestran una tasa de disparo diferencial luego de la devaluación. Próximas réplicas de este estudio permitirán corroborar la tendencia encontrada hasta el momento.

Conclusión general:

Los resultados de este capítulo mostraron una actividad diferencial de la corteza prefrontal medial luego de la devaluación de la recompensa. Indistintamente si la recompensa es una solución azucarada o alimento sólido, la CPFm muestra una

mayor actividad luego de la devaluación, y esta actividad podría estar relacionada con un cambio en la conducta de los sujetos.

En el Experimento 8, se observa un aumento de la actividad de la corteza cingulada anterior luego de la primera sesión post-cambio. Este cambio en la actividad también se condice con un aumento de la conducta de *rearing* y de ambulación. En cuanto al desempeño, aún en la primera sesión post-cambio no se observa una disminución significativa del tiempo de recorrido, ya que el efecto de CNSi depende de la formación de una conducta anticipatoria, que generalmente se observa en la segunda sesión post-cambio.

En el Experimento 9, se observa un aumento de la actividad de las neuronas registradas en la sesión 11, 200 milisegundos después de la aparición del tono. A su vez, se observa un cambio en el comportamiento de los sujetos que suprimen la respuesta cuando perciben la devaluación de la concentración de la solución. Al mismo tiempo, en la sesión 12 se encuentra un aumento significativo de la tasa de disparo general de las neuronas.

En ambos casos, parece existir una relación entre la actividad de la CPFm y el cambio en la conducta que se observa luego de la devaluación. Estas observaciones resultan novedosas para la bibliografía del fenómeno de CNSi, ya que anteriormente no se habían obtenido resultados sobre el papel de esta estructura sin utilizar técnicas de lesiones irreversibles. Como se describió previamente, la CPFm se ve activada en circunstancias donde se necesita desambiguar acciones relacionadas a estímulos cambiantes en el ambiente. La idea de que los sujetos en ambos experimentos cambian la estrategia comportamental ante un contexto que predice un refuerzo, pero que efectivamente presenta otro, parece indicar que se requiere de esta estructura que podría actuar como un sitio de relevo de la información para modificar la conducta. En este punto, es interesante recalcar que animales sin CPFm no presentan un efecto de CNSi tal y como se presenta en mamíferos, mostrando un ajuste paulatino a la nueva recompensa obtenida. A su vez, mamíferos con una CPFm subdesarrollada (por ejemplo, ratas neonatas) tampoco muestran el efecto de supresión desproporcionada de la conducta luego de la devaluación de una solución azucarada. Los resultados presentados en esta Tesis apuntan en esta dirección, proponiendo la CPFm como una estructura clave en el fenómeno de contraste instrumental, que está relacionada al cambio de comportamiento (posiblemente a la supresión rápida de la conducta), y que podría ser objeto de estudio de otros fenómenos paradójicos del

reforzamiento que tampoco se presentan en otros grupos de animales. El conocimiento de su funcionamiento en paradigmas donde se presentan cambios sorpresivos de la recompensa puede dar lugar a la interpretación de conductas que se expresan para atravesar situaciones cotidianas de fallas en la predicción de refuerzos.

Capítulo 5

Conclusiones generales y direcciones futuras

Los resultados obtenidos en esta tesis representan un avance en el campo del estudio de los fenómenos paradójicos del reforzamiento, particularmente del CNSi, y de sus bases neurales. Los Capítulos 2 y 3 se centraron en determinar la forma en que una serie de parámetros modulan la aparición del efecto de contraste luego de la devaluación de una recompensa. Por otro lado, los resultados del Capítulo 4, aun siendo preliminares, permitieron comenzar a describir el papel de la CPFm en el fenómeno de CNSi.

Los Experimentos 1, 3, 4, 5 y 6 incluyeron condiciones experimentales que implicaban una devaluación del refuerzo en una proporción de 8:1. En todos los casos, esta devaluación sucedió después de una serie de ensayos reforzados de forma continua. Sin embargo, solamente en el Experimento 6 se obtuvo un efecto de CNSi, por lo que la mera devaluación del incentivo no es suficiente para detectar un efecto de CNS. La experiencia previa con el reforzador alto parecería ser una de las condiciones clave para la expresión del fenómeno. El protocolo que obtuvo un efecto de contraste fue el de mayor cantidad de ensayos pre-cambio (16 sesiones de ensayos masivos). Por otra parte, cuando los animales eran entrenados utilizando ensayos distribuidos (ITI de 24 hs), el efecto se observó solamente utilizando 24 ensayos pre-cambio (Fernández et al., 2024).

Así, podría concluirse de esta serie experimental que la experiencia previa a la devaluación del incentivo debe ser suficientemente larga. En términos teóricos podríamos suponer que el número de ensayos previos afecta la certidumbre que tiene el animal sobre la aparición del refuerzo, es decir, afecta la expectativa. Los sujetos que previo a la devaluación experimentan menos veces el refuerzo de alto valor tienen menos certeza, por lo que la devaluación resultará menos sorpresiva. Según la *Teoría de la Frustración*, el efecto de la supresión de la conducta se da a partir de que los sujetos experimentan la violación de una expectativa. Es decir, cuanto mayor sea la asociación entre el contexto y el refuerzo, mayor probabilidad de ejecución de la respuesta instrumental por parte de los sujetos. De la misma manera, en los mamíferos, una devaluación sorpresiva de la recompensa (superando un umbral), tiene como consecuencia la supresión de la conducta a niveles de respuesta más bajos que lo que expresan los sujetos que no experimentan la devaluación, pero siempre reciben el monto bajo del refuerzo.

El uso de ensayos masivos disminuyó el número de días necesario para obtener un efecto de CNSi robusto, lo que tiene una gran relevancia a nivel procedimental,

ya que permite replicar los experimentos rápidamente, aumentando la muestra de sujetos y favoreciendo la replicabilidad. A su vez, esto facilita la consistencia de las condiciones de entrenamiento durante todo el experimento. Mientras que para el caso de entrenamientos distribuidos un protocolo de 22 días no logró mostrar el efecto, para el caso de masivos un protocolo de 20 días sí mostró el efecto. Si bien, el número total de ensayos obviamente aumenta cuando se utilizan 4 ensayos por sesión y, por lo tanto, el entrenamiento masivo permite que los animales adquieran más experiencia en menos días, hay otro factor clave que diferencia al entrenamiento masivo del distribuido: el sistema de memoria implicado. Los sistemas de memoria y, consecuentemente las estructuras implicadas, difieren cuando se evoca un evento ocurrido 24 horas antes en comparación con un evento ocurrido minutos antes. Por ejemplo, el rol del hipocampo difiere cuando los ensayos son masivos o distribuidos (Flaherty et al., 1998). En distintos estudios, no específicamente de contraste, se ha mostrado que el desempeño de los sujetos en distintos tipos de tareas instrumentales espaciales hipocampo-dependientes, mejoran cuando los entrenamientos son masivos en comparación a distribuidos (Wingard et al., 2016). Podría decirse que el CNSi es una tarea “hipocampo dependiente”, ya que lesiones del hipocampo eliminaron el efecto de CNSi pero no el CNSc (Flaherty et al., 1998). Sin embargo, en dicho estudio se utilizó un protocolo masivo; en una condición de entrenamiento distribuido esta misma lesión podría no afectar al CNSi.

Curiosamente, los Experimentos 3 y 4 utilizan la misma cantidad de ensayos pre-cambio y la misma recompensa, con dinámicas de entrenamiento distribuido y masivo respectivamente. En el Experimento 3, con ensayos distribuidos, se muestra que no hay diferencias entre grupos en la etapa pre-cambio (todos los grupos responden de la misma manera ante distintos refuerzos). Por el contrario, en el Experimento 6 sí se encuentran diferencias entre grupos en la etapa pre-cambio. Esto sugiere que el efecto de la magnitud de la recompensa sobre el desempeño se robustece cuando la recompensa anterior fue reciente, en comparación con un refuerzo recibido el día anterior. Es más, los análisis por sesión del Experimento 6 mostraron que el efecto de la magnitud de la recompensa en la fase pre-cambio (16 vs. 2 pellets) ocurrían en los ensayos 2, 3 y 4, pero no en el primer ensayo.

Siguiendo en esta línea, el estudio de los cambios comportamentales ante nuevas condiciones en el reforzamiento, puede brindar información valiosa sobre los procesos cognitivos y emocionales que tienen que atravesar los sujetos para resolver

las situaciones dinámicas del ambiente. En este contexto, se logró avanzar en el conocimiento sobre el cambio conductual que surge como consecuencia de la devaluación de una recompensa. En el Experimento 7 se observó un aumento en las conductas de *rearing* y de ambulación, comportamientos que han sido entendidos en relación al aumento del estrés y la ansiedad. De manera interesante, este cambio comportamental no es igual en sujetos que no ejecutan la respuesta instrumental para obtener la recompensa. Este resultado fue sorpresivo y no es fácil de interpretar. Parece implicar que la devaluación de un incentivo no sea en sí misma suficiente para inducir malestar emocional. Futuras investigaciones deberán estudiar con más detalle las diferencias entre las condiciones “corredor” y “caja meta” para determinar cuál es el factor clave que produce el aumento de las conductas de *rearing* y deambulación en los animales devaluados. Una explicación tentativa para los resultados del Experimento 7 tiene que ver con el esfuerzo de respuesta, un tópico desarrollado en el segundo capítulo de esta Tesis. En los mamíferos, los requerimientos energéticos de los organismos son altos, y la idea de perder un recurso asegurado y de alta relevancia (como puede ser un alimento) requiere de mecanismos conservados que permitan hacer un *switch* entre un comportamiento de forrajeo y uno de búsqueda. La condición “corredor” requeriría un mayor esfuerzo de respuesta que la condición “caja meta” y este podría ser el factor diferencial entre las condiciones.

Otro aspecto interesante a considerar, es que la información disponible en la bibliografía muestra que las soluciones azucaradas empleadas en un protocolo de CNS en un corredor recto, no provocan un efecto de contraste instrumental que se visualice como una disminución del tiempo de recorrido (Sastre et al., 2005). Sin embargo, en el Experimento 9 de esta Tesis se consiguió generar un efecto de CNSi utilizando soluciones azucaradas en una preparación en la cual los animales estaban inmovilizados y debían responder mediante la lengua para obtener una recompensa.

Por último, la CPFm demostró ser relevante para la expresión del efecto de contraste. El conocimiento aportado por las neurociencias sobre la función y conectividad de esta región cerebral sugiere que esta región cumple un rol determinante en el CNSi. Los resultados que se presentaron aquí son los primeros datos empíricos que apoyan esa suposición. Tanto en el Experimento 8 como en el Experimento 9 se encontró actividad diferencial en esta región en animales devaluados en comparación con animales no devaluados. Ambos experimentos

utilizaron procedimientos y técnicas de registro distintas y, sin embargo, los resultados apuntan en una misma dirección.

En resumen, esta Tesis ha permitido concluir que:

1. El fenómeno de contraste instrumental ocurre con un número mínimo de ensayos de adquisición o pre-cambio (es dependiente del establecimiento de una expectativa), y es sensible a las condiciones de entrenamiento (masivo o distribuido). En nuestra situación de experimental, para la condición de entrenamiento distribuido se requiere de un número alto de sesiones diarias de pre-cambio (i.e., 24 sesiones de un solo ensayo por día); mientras que para el caso de entrenamiento masivo, el efecto emerge tras 12 sesiones diarias previas al cambio (con 4 ensayos por sesión).
2. El fenómeno de contraste instrumental induce la aparición de otras conductas medibles atribuibles a un estado de activación emocional. Tales conductas ocurrirían como efecto del entrenamiento en el corredor recto, y no simplemente por la devaluación del incentivo.
3. La actividad neural de al menos un sector de la corteza pre-frontal medial se altera por la devaluación del incentivo, tanto en una situación de corredor recto como en una tarea instrumental con restricción de movimiento.

Los resultados aquí presentados representan el comienzo de nuevas líneas experimentales en el laboratorio de Biología del Comportamiento del IBYME, y en un futuro se espera avanzar sobre la descripción de los circuitos neurales subyacentes fundamentales para la aparición de la respuesta de frustración. Sin embargo, los experimentos presentados tienen como limitación que se hicieron sólo con ejemplares machos de rata Long Evans, por lo que a futuro será necesario también explorar los parámetros aquí propuestos en hembras de la misma cepa y especie.



Firma Doctoranda

Rocío Candela Fernández



Firma Director Adjunto

Dr Martín M. Puddington



Firma Director

Dr. Rubén N. Muzio

Bibliografía

- Abraham, A. D., Neve, K. A., & Lattal, K. M. (2014). Dopamine and extinction: A convergence of theory with fear and reward circuitry. *Neurobiology of Learning and Memory*, 108, 65-77.
- Abeles, M., & Goldstein, M. H. (1977). Multispike Train Analysis. *Proceedings of the IEEE*, 65(5), 762-773.
- Alexander, W. H., & Brown, J. W. (2011). Medial prefrontal cortex as an action-outcome predictor. *Nature Neuroscience*, 14(10), 1338-1344.
- Amsel, A. (1958). The role of frustrative nonreward in noncontinuous reward situations. *Psychological Bulletin*, 55(2), 102-119.
- Amsel, A. (1992). *Frustration Theory: An analysis of dispositional learning and memory*. Cambridge University Press.
- Amsel, A., Radek, C. C., Graham, M., & Letz, R. (1977). Ultrasound emission in infant rats as an indicant of arousal during appetitive learning and extinction. *Science*, 197(4305), 786-788.
- Anderson, A. K., Christoff, K., Stappen, I., Panitz, D., Ghahremani, D. G., Glover, G., ... & Sobel, N. (2003). Dissociated neural representations of intensity and valence in human olfaction. *Nature Neuroscience*, 6(2), 196-202.
- Anderson, D. J., & Adolphs, R. (2014). A framework for studying emotions across species. *Cell*, 157(1), 187-200.
- Arruda-Carvalho, M., & Clem, R. L. (2014). Pathway-selective adjustment of prefrontal-amygdala transmission during fear encoding. *Journal of Neuroscience*, 34(47), 15601-15609.
- Arruda-Carvalho, M., & Clem, R. L. (2015). Prefrontal-amygdala fear networks come into focus. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 9:145.
- Augur, I. F., Wyckoff, A. R., Aston-Jones, G., Kalivas, P. W., & Peters, J. (2016). Chemogenetic activation of an extinction neural circuit reduces cue-induced reinstatement of cocaine seeking. *Journal of Neuroscience*, 36(39), 10174-10180.
- Balleine, B. (1992). Instrumental performance following a shift in primary motivation depends on incentive learning. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 18(3), 236-250.

- Barthó, P., Hirase, H., Monconduit, L., Zugaro, M., Harris, K. D. & Buzsáki, G. (2004). Characterization of neocortical principal cells and interneurons by network interactions and extracellular features. *Journal of Neurophysiology*, 92(1): 600-608.
- Becker, H. C., & Flaherty, C. F. (1982). Influence of ethanol on contrast in consummatory behavior. *Psychopharmacology*, 77, 253-258.
- Becker, H. C., Jarvis, M. F., Wagner, G. C., & Flaherty, C. F. (1984). Medial and lateral amygdectomy differentially influences consummatory negative contrast. *Physiology and Behavior*, 33(5), 707-712.
- Becker, H. C. (1986). Comparison of the effects of the benzodiazepine midazolam and three serotonin antagonists on a consummatory conflict paradigm. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 24(4), 1057-1064.
- Bentosela, M., Ruetti, E., Muzio, R. N., Mustaca, A. E., & Papini, M. R. (2006). Administration of corticosterone after the first downshift trial enhances consummatory successive negative contrast. *Behavioral Neuroscience*, 120(2), 371-376.
- Berretta, S. (2005). Cortico-amygdala circuits: role in the conditioned stress response. *Stress*, 8(4), 221-232.
- Binkley, K. A., Webber, E. S., Powers, D. D., & Cromwell, H. C. (2014). Emotion and relative reward processing: An investigation on instrumental successive negative contrast and ultrasonic vocalizations in the rat. *Behavioural Processes*, 107, 167-174.
- Bissière, S., Plachta, N., Hoyer, D., McAllister, K. H., Olpe, H. R., Grace, A. A., & Cryan, J. F. (2008). The rostral anterior cingulate cortex modulates the efficiency of amygdala-dependent fear learning. *Biological Psychiatry*, 63(9), 821-831.
- Burns, R. A., Dupree, E. S., & Lorig, T. S. (1978). Successive reductions of liquid and solid sucrose rewards. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 12(5), 351-354.
- Capaldi, E. D. (1972). Resistance to extinction in rats as a function of deprivation level and schedule of reward in acquisition. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 79(1), 90-98.
- Cardinal, R. N., Parkinson, J. A., Lachenal, G., Halkerston, K. M., Rudarakanchana, N., Hall, J., ... & Everitt, B. J. (2002). Effects of selective excitotoxic lesions

- of the nucleus accumbens core, anterior cingulate cortex, and central nucleus of the amygdala on autoshaping performance in rats. *Behavioral Neuroscience*, 116(4), 553-567.
- Conrad, S. E., Guarino, S., & Papini, M. R. (2020). Surprising nonreward and response effort: Extinction after progressive-ratio training in rats and pigeons. *Learning and Motivation*, 72, 101676.
- Cools, R., & D'Esposito, M. (2011). Inverted-U-shaped dopamine actions on human working memory and cognitive control. *Biological Psychiatry*, 69(12), e113-e125.
- Couvillon, P. A., & Bitterman, M. E. (1985). Effect of experience with a preferred food on consummatory responding for a less preferred food in goldfish. *Animal Learning and Behavior*, 13(4), 433-438.
- Crespi, L. P. (1942). Quantitative variation of incentive and performance in the white rat. *The American Journal of Psychology*, 55, 467-517.
- Daly, H. B. (1974). Arousal of frustration following gradual reductions in reward magnitude in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 86(6), 1149-1155.
- Daneri, M. F., Papini, M. R., & Muzio, R. N. (2007). Common toads (*Bufo arenarum*) learn to anticipate and avoid hypertonic saline solutions. *Journal of Comparative Psychology*, 121(4), 419.
- Daniel, A. M., Wood, M., Pellegrini, S., Norris, J. N., & Papini, M. R. (2008). Can contextual cues control consummatory successive negative contrast? *Learning and Motivation*, 39(2), 146-162.
- de Lima MAX, Baldo, M. V. C., Oliveira, F. A., & Canteras, N. S. (2022). The anterior cingulate cortex and its role in controlling contextual fear memory to predatory threats. *Elife*, 5; 11:e67007.
- Di Lollo, V., & Beez, V. (1966). Negative contrast effect as a function of magnitude of reward decrement. *Psychonomic Science*, 5(3), 99-100.
- Domjam, M. (2007). *Principios de aprendizaje y conducta*. Ediciones Paraninfo, SA.
- Do-Monte, F. H., Manzano-Nieves, G., Quiñones-Laracuate, K., Ramos-Medina, L., & Quirk, G. J. (2015). Revisiting the role of infralimbic cortex in fear extinction with optogenetics. *Journal of Neuroscience*, 35(8), 3607-3615.
- Eagle, D. M., & Robbins, T. W. (2003). Lesions of the medial prefrontal cortex or nucleus accumbens core do not impair inhibitory control in rats performing a

- stop-signal reaction time task. *Behavioural Brain Research*, 146(1-2), 131-144.
- Eddy, M. C., Todd, T. P., Bouton, M. E., & Green, J. T. (2016). Medial prefrontal cortex involvement in the expression of extinction and ABA renewal of instrumental behavior for a food reinforcer. *Neurobiology of Learning and Memory*, 128, 33-39.
- Elliot, M. H. (1928). The effect of change of reward on the maze performance of rats. *University of California Publications in Psychology*, 4, 19-30.
- Ellwood, I. T., Patel, T., Wadia, V., Lee, A. T., Liptak, A. T., Bender, K. J., et al. (2017). Tonic or phasic stimulation of dopaminergic projections to prefrontal cortex causes mice to maintain or deviate from previously learned behavioral strategies. *Journal of Neuroscience*, 37, 8315–8329.
- Elston, G. N. (2003). Cortex, cognition and the cell: new insights into the pyramidal neuron and prefrontal function. *Cerebral Cortex*, 13(11), 1124-1138.
- Ettenberg, A. (2009). The runway model of drug self-administration. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 91(3), 271-277.
- Fee, M. S., Mitra, P. P., & Kleinfeld, D. A. V. I. D. (1996). Variability of extracellular spike waveforms of cortical neurons. *Journal of Neurophysiology*, 76(6), 3823-3833.
- Fernández, R. C., Puddington, M. M., & Muzio, R. N. (2024). Avances en la investigación sobre las bases neurales del Contraste Negativo Sucesivo. *Revista Interdisciplinaria*. In Press.
- Fernández, R. C., Puddington, M. M., Kliger, R., Del Core, J., Jure, I., Labombarda, F., Papini, M. R. & Muzio, R. N. (2024). Instrumental successive negative contrast in rats: Trial distribution, reward magnitude, and prefrontal cortex activation. *Physiology and Behavior*, 278, 114511.
- Fitzgerald, P. J., Whittle, N., Flynn, S. M., Graybeal, C., Pinard, C. R., Gunduz-Cinar, O., ... & Holmes, A. (2014). Prefrontal single-unit firing associated with deficient extinction in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 113, 69-81.
- Flaherty, C. F. (1996). *Incentive relativity*. Cambridge University Press.
- Flaherty, C. F., Clarke, S., & Coppotelli, C. (1996). Lack of tolerance to contrast-reducing actions of chlordiazepoxide with repeated reward reductions. *Physiology and Behavior*, 60(2), 645-652.

- Flaherty, C. F., & Caprio, M. (1976). The dissociation of instrumental and consummatory measures of contrast. *The American Journal of Psychology*, 89(3), 485-498.
- Flaherty, C. F., & Kelly, J. (1973). Effect of deprivation state on successive negative contrast. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 1(5), 365-367.
- Flaherty, C. F., Becker, H. C., & Pohorecky, L. (1985). Correlation of corticosterone elevation and negative contrast varies as a function of postshift day. *Animal Learning and Behavior*, 13(3), 309-314.
- Flaherty, C. F., Becker, H. C., Checke, S., Rowan, G. A., & Grigson, P. S. (1992). Effect of chlorpromazine and haloperidol on negative contrast. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 42(1), 111-117.
- Flaherty, C. F., Blitzler, R., & Collier, G. H. (1978). Open-field behaviors elicited by reward reduction. *The American Journal of Psychology*, 91(3), 429-443.
- Flaherty, C. F., Coppotelli, C., Hsu, D., & Otto, T. (1998). Excitotoxic lesions of the hippocampus disrupt runway but not consummatory contrast. *Behavioural Brain Research*, 93(1-2), 1-9.
- Floresco, S. B. (2015). The nucleus accumbens: an interface between cognition, emotion, and action. *Annual Review of Psychology*, 66(1), 25-52.
- Fredrickson, B. L. (1998). What good are positive emotions? *Review of General Psychology*, 2(3), 300-319.
- Friard, O., & Gamba, M. (2016). BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1325-1330.
- Ghazizadeh, A., Ambroggi, F., Odean, N., & Fields, H. L. (2012). Prefrontal cortex mediates extinction of responding by two distinct neural mechanisms in accumbens shell. *Journal of Neuroscience*, 32(2), 726-737.
- Genn, R. F., Ahn, S., & Phillips, A. G. (2004). Attenuated dopamine efflux in the rat nucleus accumbens during successive negative contrast. *Behavioral Neuroscience*, 118(4), 869.
- Giustino, T. F., Fitzgerald, P. J., & Maren, S. (2016). Fear expression suppresses medial prefrontal cortical firing in rats. *PloS One*, 11(10), e0165256.
- González, A. & Northcutt, R.G. (2009). An immunohistochemical approach to lungfish telencephalic organization. *Brain, Behavior and Evolution*, 74, 43-55.

- González, R. C., Eskin, R. M., & Bitterman, M. E. (1962). Extinction in the fish after partial and consistent reinforcement with number of reinforcements equated. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 55(3), 381-386.
- Gore, F., Schwartz, E. C., Brangers, B. C., Aladi, S., Stujenske, J. M., Likhtik, E., ... & Axel, R. (2015). Neural representations of unconditioned stimuli in basolateral amygdala mediate innate and learned responses. *Cell*, 162(1), 134-145.
- Graf, C. L. (1972). Spaced-trial partial reward in the lizard. *Psychonomic Science*, 27(3), 153-154.
- Gray, C. M., Maldonado, P. E., Wilson, M., & McNaughton, B. (1995). Tetrodes markedly improve the reliability and yield of multiple single-unit isolation from multi-unit recordings in cat striate cortex. *Journal of Neuroscience Methods*, 63(1-2), 43-54.
- Grigson, P. S., Spector, A. C., & Norgren, R. (1994). Lesions of the pontine parabrachial nuclei eliminate successive negative contrast effects in rats. *Behavioral Neuroscience*, 108(4), 714-723.
- Guarino, S., Hagen, C., Nguyen, Q., & Papini, M. R. (2023). Frustrative nonreward and the basal ganglia: Chemogenetic inhibition and excitation of the nucleus accumbens and globus pallidus externus during reward downshift. *Neurobiology of Learning and Memory*, 200, 107736.
- Gurowitz, E. M., Rosen, A. J., & Tessel, R. E. (1970). Incentive shift performance in cingulectomized rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 70(3), 476-481.
- Hanmer, L. A., Riddell, P. M., & Williams, C. M. (2010). Using a runway paradigm to assess the relative strength of rats' motivations for enrichment objects. *Behavior Research Methods*, 42(2), 517-524.
- Harro, J. (2018). Animals, anxiety, and anxiety disorders: How to measure anxiety in rodents and why. *Behavioural Brain Research*, 352, 81-93.
- Herrera, D. G., & Robertson, H. A. (1996). Activation of c-fos in the brain. *Progress in neurobiology*, 50(2-3), 83-107.
- Honey, R. C. (1996). The temporal dynamics of a visual discrimination: The role of stimulus comparison and opponent processes. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 22(4), 461-471.

- Howland, J. G., Ito, R., Lapish, C. C., & Villaruel, F. R. (2022). The rodent medial prefrontal cortex and associated circuits in orchestrating adaptive behavior under variable demands. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 135, 104569.
- Hull, C. L. (1943). *Principles of Behavior: An introduction to behavior theory*. Appleton-Century-Crofts, New York.
- Hull, C. L. (1952). *A Behavior System*. Yale University Press, New Haven, CT.
- Inzlicht, M., Shenhav, A., & Olivola, C. Y. (2018). The effort paradox: Effort is both costly and valued. *Trends in Cognitive Sciences*, 22(4), 337-349.
- Ishida, M., & Papini, M. R. (1997). Massed trial overtraining effects on extinction and reversal performance in turtles (*Geoclemys reevesii*). *The Quarterly Journal of Experimental Psychology B*, 50(1), 1-16.
- Ishikawa, A., Ambroggi, F., Nicola, S. M., & Fields, H. L. (2008). Dorsomedial prefrontal cortex contribution to behavioral and nucleus accumbens neuronal responses to incentive cues. *Journal of Neuroscience*, 28(19), 5088-5098.
- Ishikawa, A., Ambroggi, F., Nicola, S. M., & Fields, H. L. (2008). Contributions of the amygdala and medial prefrontal cortex to incentive cue responding. *Neuroscience*, 155(3), 573-584.
- Johnson, N., & Viney, W. (1970). Resistance to extinction as a function of effort. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 71(1), 171-174.
- Kawasaki, K., Annicchiarico, I., Glueck, A. C., Morón, I., & Papini, M. R. (2017). Reward loss and the basolateral amygdala: A function in reward comparisons. *Behavioural Brain Research*, 331, 205-213.
- Kawasaki, K., Glueck, A. C., Annicchiarico, I., & Papini, M. R. (2015). Function of the centromedial amygdala in reward devaluation and open-field activity. *Neuroscience*, 303, 73-81.
- Kazdin, A. E. (2012). *Behavior modification in applied settings*. Waveland Press.
- Keistler, C., Barker, J. M., & Taylor, J. R. (2015). Infralimbic prefrontal cortex interacts with nucleus accumbens shell to unmask expression of outcome-selective Pavlovian-to-instrumental transfer. *Learning and Memory*, 22(10), 509-513.
- Killeen, P. R. (1988). The reflex reserve. *Journal of Experimental Analysis of Behavior*, 50(2), 319-331.

- Laubach, M., Amarante, L. M., Swanson, K., & White, S. R. (2018). What, if anything, is rodent prefrontal cortex? *Eneuro*, 5(5), 315-318.
- Lawrence, D. H. & Festinger, L. (1962). *Deterrents and reinforcement: The psychology of insufficient reward*. Stanford: Stanford University Press.
- Leszczuk, M. H., & Flaherty, C. F. (2000). Lesions of nucleus accumbens reduce instrumental but not consummatory negative contrast in rats. *Behavioural Brain Research*, 116(1), 61-79.
- Lever, C., Burton, S., & O'Keefe, J. (2006). Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Reviews in the Neurosciences*, 17(1-2), 111-134.
- Liao, R. M., & Chuang, F. J. (2003). Differential effects of diazepam infused into the amygdala and hippocampus on negative contrast. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 74(4), 953-960.
- Lin, J. Y., Roman, C., & Reilly, S. (2009). Insular cortex and consummatory successive negative contrast in the rat. *Behavioral Neuroscience*, 123(4), 810-814.
- Longo, N., & Bitterman, M. E. (1960). The effect of partial reinforcement with spaced practice on resistance to extinction in the fish. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 53(2), 169-172.
- Lowes, G., & Bitterman, M. E. (1967). Reward and learning in the Goldfish. *Science*, 157, 455-457.
- Lydall, E. S., Gilmour, G., & Dwyer, D. M. (2010). Rats place greater value on rewards produced by high effort: An animal analogue of the "effort justification" effect. *Journal of Experimental Social Psychology*, 46(6), 1134-1137.
- Mackintosh, N. J. (1974). *The Psychology of Animal Learning*. Academic Press.
- Manzo, L., Donaire, R., Sabariego, M., Papini, M. R., & Torres, C. (2015). Anti-anxiety self-medication in rats: oral consumption of chlordiazepoxide and ethanol after reward devaluation. *Behavioural Brain Research*, 278, 90-97.
- McCullough, L. D., & Salamone, J. D. (1992). Involvement of nucleus accumbens dopamine in the motor activity induced by periodic food presentation: a microdialysis and behavioral study. *Brain Research*, 592(1-2), 29-36.
- Medina, L., & Abellán, A. (2009). Development and evolution of the pallium. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20, 698-711.

- Medina, L.; Bupesh, M. & Abellán, A. (2011). Contribution of genoarchitecture to understanding forebrain evolution and development, with particular emphasis on the amygdala. *Brain, Behavior and Evolution*, 3, 216-236.
- Mininni, C. J., Caiafa, C. F., Zanutto, B. S., Tseng, K. Y., & Lew, S. E. (2017). Efficient enhancement of information in the prefrontal cortex during the presence of reward predicting stimuli. *PLoS One*, 12, 1-16.
- Morton, M. P., Denagamage, S., Blume, I. J., Reynolds, J. H., Jadi, M. P., & Nandy, S. (2024). Brain state and cortical layer-specific mechanisms underlying perception at threshold. *ELife*, 12, RP91722.
- Moreno, N. & González, A. (2004). Localization and connectivity of the lateral amygdala in anuran amphibians. *The Journal of Comparative Neurology*, 479, 130-148.
- Moreno, N. & González, A. (2006). The common organization of the amygdaloid complex in tetrapods: New concepts based on developmental, hodological and neurochemical data in anuran amphibians. *Progress in Neurobiology*, 78, 61-90.
- Moreno, N., González, A., & Rétaux, S. (2009). Development and evolution of the subpallium. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20: 735-743.
- Mustaca, A. E. (2018). Frustración y conductas sociales. *Avances en Psicología Latinoamericana*, 36(1), 65-81.
- Mustaca, A. E., Bentosela, M., & Papini, M. R. (2000). Consummatory successive negative contrast in mice. *Learning and Motivation*, 31(3), 272-282.
- Mustaca, A. E., Bentosela, M., Ruetti, E., Kamenetzky, G., Cuenya, L., Justel, N., Lopez Seal, F., Fosachea, S., & Papini, M. (2009). Similitudes y discrepancias en dos modelos animales de frustración. En: *Recientes desarrollos iberoamericanos en investigación en Ciencias del Comportamiento*. Ed. CIIPME-CONICET (edición 20 Aniversario de la Asociación Argentina de Ciencias del Comportamiento, AACC). Bs. As., Argentina. Tomo II, 921-940.
- Mustaca, A. E., Martínez, C., & Papini, M. R. (2000). Surprising nonreward reduces aggressive behavior in rats. *International Journal of Comparative Psychology*, 13(1), 91-100.

- Muzio, R. N., Pistone Creydt, V., Iurman, M., Rinaldi, M. A., Sirani, B., & Papini, M. R. (2011). Incentive or habit learning in amphibians? *PLoS One*, 6(11), e25798.
- Muzio, R. N., Ruetti, E., & Papini, M. R. (2006). Determinants of instrumental extinction in terrestrial toads (*Bufo arenarum*). *Learning and Motivation*, 37(4), 346-356.
- Muzio, R. N., Segura, E. T., & Papini, M. R. (1992). Effect of schedule and magnitude of reinforcement on instrumental learning in the toad, *Bufo arenarum*. *Learning and Motivation*, 23(4), 406-429.
- Muzio, R. N., Segura, E. T., & Papini, M. R. (1994). Learning under partial reinforcement in the toad (*Bufo arenarum*): Effects of lesions in the medial pallium. *Behavioral and Neural Biology*, 61(1), 36-46.
- National Research Council, Life Studies, Institute for Laboratory Animal Research, Committee for the Update of the Guide for the Care, and Use of Laboratory Animals. (2010). Guide for the care and use of laboratory animals.
- Norris, J. N., Ortega, L. A., & Papini, M. R. (2011). Posttrial D-cycloserine enhances the emotional memory of an incentive downshift event. *Behavioural Brain Research*, 223(2), 348-355.
- O'Neill, P. K., Gore, F., & Salzman, C. D. (2018). Basolateral amygdala circuitry in positive and negative valence. *Current Opinion in Neurobiology*, 49, 175-183.
- Ortega, L. A., Glueck, A. C., Daniel, A. M., Prado-Rivera, M. A., White, M. M., & Papini, M. R. (2014). Memory interfering effects of chlordiazepoxide on consummatory successive negative contrast. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 116, 96-106.
- Ortega, L. A., Glueck, A. C., Uhelski, M., Fuchs, P. N., & Papini, M. R. (2013). Role of the ventrolateral orbital cortex and medial prefrontal cortex in incentive downshift situations. *Behavioural Brain Research*, 244, 120-129.
- Ortega, L. A., Uhelski, M., Fuchs, P. N., & Papini, M. R. (2011). Impairment of recovery from incentive downshift after lesions of the anterior cingulate cortex: Emotional or cognitive deficits. *Behavioral Neuroscience*, 125, 988-995.
- Ortega, L. A., Solano, J. L., Torres, C., & Papini, M. R. (2017). Reward loss and addiction: Opportunities for cross-pollination. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 154, 39-52.

- Otis, J. M., Namboodiri, V. M., Matan, A. M., Voets, E. S., Mohorn, E. P., Kosyk, O., ... & Stuber, G. D. (2017). Prefrontal cortex output circuits guide reward seeking through divergent cue encoding. *Nature*, 543(7643), 103-107.
- Packard, M. G., & Goodman, J. (2013). Factors that influence the relative use of multiple memory systems. *Hippocampus*, 23(11), 1044-1052.
- Packard, M. G., & McGaugh, J. L. (1996). Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65(1), 65-72.
- Papini, M. R. (2002). Pattern and process in the evolution of learning. *Psychological Review*, 109(1), 186-201.
- Papini, M. R. (2003). Comparative psychology of surprising nonreward. *Brain, Behavior and Evolution*, 62(2), 83-95.
- Papini, M. R., & Dudley, R. T. (1997). Consequences of surprising reward omissions. *Review of General Psychology*, 1(2), 175-197.
- Papini, M. R., & Ishida, M. (1994). Role of magnitude of reinforcement in spaced-trial instrumental learning in turtles (*Geoclemys reevesii*). *The Quarterly Journal of Experimental Psychology B*, 47(1b), 1-13.
- Papini, M. R., Guarino, S., Hagen, C., & Torres, C. (2022). Incentive disengagement and the adaptive significance of frustrative nonreward. *Learning and Behavior*, 50(3), 372-388.
- Papini, M. R., & Pellegrini, S. (2006). Scaling relative incentive value in consummatory behavior. *Learning and Motivation*, 37(4), 357-378.
- Papini, M. R., Muzio, R. N., & Segura, E. T. (1995). Instrumental learning in toads (*Bufo arenarum*): Reinforcer magnitude and the medial pallium. *Brain, Behavior and Evolution*, 46(2), 61-71.
- Parkinson, J. A., Willoughby, P. J., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2000). Disconnection of the anterior cingulate cortex and nucleus accumbens core impairs Pavlovian approach behavior: Further evidence for limbic cortical-ventral striatopallidal systems. *Behavioral Neuroscience*, 114(1), 42-63.
- Pascoli, V., Terrier, J., Espallergues, J., Valjent, E., O'Connor, E. C., & Lüscher, C. (2014). Contrasting forms of cocaine-evoked plasticity control components of relapse. *Nature*, 509(7501), 459-464.
- Passingham, R. E., & Wise, S. P. (2012). *The neurobiology of the prefrontal cortex: Anatomy, evolution, and the origin of insight*. OUP Oxford.

- Pastor, V., & Medina, J. H. (2021). Medial prefrontal cortical control of reward-and aversion-based behavioral output: Bottom-up modulation. *European Journal of Neuroscience*, 53(9), 3039-3062.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates: Hard cover edition*. Elsevier.
- Pecoraro, N., & Dallman, M. F. (2005). c-Fos after incentive shifts: Expectancy, incredulity, and recovery. *Behavioral Neuroscience*, 119(2), 366-387.
- Pecoraro, N., de Jong, H., & Dallman, M. F. (2009). An unexpected reduction in sucrose concentration activates the HPA axis on successive post shift days without attenuation by discriminative contextual stimuli. *Physiology and Behavior*, 96(4-5), 651-661.
- Pecoraro, N., De Jong, H., Ginsberg, A. B., & Dallman, M. F. (2008). Lesions of the medial prefrontal cortex enhance the early phase of psychogenic fever to unexpected sucrose concentration reductions, promote recovery from negative contrast and enhance spontaneous recovery of sucrose-entrained anticipatory activity. *Neuroscience*, 153(4), 901-917.
- Pecoraro, N., Ginsberg, A. B., Akana, S. F., & Dallman, M. F. (2007). Temperature and activity responses to sucrose concentration reductions occur on the 1st but not the 2nd day of concentration shifts, and are blocked by low, constant glucocorticoids. *Behavioral Neuroscience*, 121(4), 764-778.
- Pellegrini, S., & Mustaca, A. (2000). Consummatory successive negative contrast with solid food. *Learning and Motivation*, 31(2), 200-209.
- Pellegrini, S., & Papini, M. R. (2007). Scaling relative incentive value in anticipatory behavior. *Learning and Motivation*, 38, 128-154.
- Pellegrini, S., Muzio, R. N., Mustaca, A. E., & Papini, M. R. (2004). Successive negative contrast after partial reinforcement in the consummatory behavior of rats. *Learning and Motivation*, 35(4), 303-321.
- Pellegrini, S., Seal, M. F. L., & Papini, M. R. (2008). Scaling relative incentive value: Different adjustments to incentive downshift in pigeons and rats. *Behavioural Processes*, 79(3), 182-188.
- Pérez-López, J. L., Contreras-López, R., Ramírez-Jarquín, J. O., & Tecuapetla, F. (2018). Direct glutamatergic signaling from midbrain dopaminergic neurons onto pyramidal prefrontal cortex neurons. *Frontiers in Neural Circuits*, 12:70.

- Pereyra, A. E., Mininni, C. J., & Zanutto, B. S. (2021). Information capacity and robustness of encoding in the medial prefrontal cortex are modulated by the bioavailability of serotonin and the time elapsed from the cue during a reward-driven task. *Scientific Reports*, 11(1), 13882.
- Peters, J., Kalivas, P. W., & Quirk, G. J. (2009). Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. *Learning and Memory*, 16(5), 279-288.
- Phelps, C. E., Mitchell, E. N., Nutt, D. J., Marston, H. M., & Robinson, E. S. J. (2015). Psychopharmacological characterisation of the successive negative contrast effect in rats. *Psychopharmacology*, 232, 2697-2709.
- Phillips, A. G., Ahn, S., & Howland, J. G. (2003). Amygdalar control of the mesocorticolimbic dopamine system: parallel pathways to motivated behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(6), 543-554.
- Pinkston, J. W. (2021). A review of the behavioral effects of response force: Perspectives on measurement and functions. *Behavioural Processes*, 186, 104342.
- Puddington, M. M., Papini, M. R., & Muzio, R. N. (2018). Duration of extinction trials as a determinant of instrumental extinction in terrestrial toads (*Rhinella arenarum*). *Animal Cognition*, 21, 165-174.
- Quirk, G. J., Likhtik, E., Pelletier, J. G., & Paré, D. (2003). Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. *Journal of Neuroscience*, 23(25), 8800-8807.
- Redondo, R. L., Kim, J., Arons, A. L., Ramirez, S., Liu, X., & Tonegawa, S. (2014). Bidirectional switch of the valence associated with a hippocampal contextual memory engram. *Nature*, 513(7518), 426-430.
- Reilly, S., & Trifunovic, R. (1999). Gustatory thalamus lesions eliminate successive negative contrast in rats. *Behavioral Neuroscience*, 113(6), 1242.
- Rescorla, R. A. y Wagner, A. R. (1972). A theory of pavlovian conditioning: variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. En A.H. Black y W.F. Prokasy (Eds.) *Classical Conditioning II: Current theory and research*. Nueva York: Applaton-Century-Crofts.
- Robbins, T. W., & Koob, G. F. (1980). Selective disruption of displacement behaviour by lesions of the mesolimbic dopamine system. *Nature*, 285(5764), 409-412.

- Rodríguez, M. N., Puddington, M. M., Papini, M. R., & Muzio, R. N. (2024). Transfer between tasks involving frustrative nonreward in rats: From consummatory to instrumental successive negative contrast. *Learning and Motivation*, 87, 101998.
- Rosas, J. M., Callejas-Aguilera, J. E., Escarabajal, M. D., Gómez, M. J., de la Torre, L., Agüero, Á., ... & Torres, C. (2007). Successive negative contrast effect in instrumental runway behaviour: a study with Roman high-(RHA) and Roman low-(RLA) avoidance rats. *Behavioural Brain Research*, 185(1), 1-8.
- Rossant C, Kadir SN, Goodman DFM, Schulman J, Hunter MLD, Saleem AB, Grosmark A, Belluscio M, Denfield GH, Ecker AS, Tolias AS, Solomon S, Buzsaki G, Carandini M y Harris KD. 2016. «Spike sorting for large, dense electrode arrays». *Nature Neuroscience* 19(4):634-641.
- Rudebeck, P. H., & Izquierdo, A. (2022). Foraging with the frontal cortex: a cross-species evaluation of reward-guided behavior. *Neuropsychopharmacology*, 47(1), 134-146.
- Rudebeck, P. H., Walton, M. E., Smyth, A. N., Bannerman, D. M., & Rushworth, M. F. (2006). Separate neural pathways process different decision costs. *Nature Neuroscience*, 9(9), 1161-1168.
- Ruetti, E., Justel, N., Mustaca, A. E., & Papini, M. R. (2009). Posttrial corticosterone administration enhances the effects of incentive downshift: Exploring the boundaries of this effect. *Behavioral Neuroscience*, 123(1), 137-144.
- Russell, J. A. (1980). A circumplex model of affect. *Journal of Personality and Social Psychology*, 39(6), 1161-1178.
- Salamone, J. D., Correa, M., Farrar, A., & Mingote, S. M. (2007). Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits. *Psychopharmacology*, 191, 461-482.
- Salamone, J. D., Correa, M., Yohn, S. E., Yang, J. H., Somerville, M., Rotolo, R. A., & Presby, R. E. (2017). Behavioral activation, effort-based choice, and elasticity of demand for motivational stimuli: Basic and translational neuroscience approaches. *Motivation Science*, 3(3), 208-229.
- Salamone, J. D., & Correa, M. (2024). The neurobiology of activational aspects of motivation: Exertion of effort, effort-based decision making, and the role of dopamine. *Annual Review of Psychology*, 75(1), 1-32.

- Salinas, J. A., Parent, M. B., & McGaugh, J. L. (1996). Ibotenic acid lesions of the amygdala basolateral complex or central nucleus differentially affect the response to reductions in reward. *Brain Research*, 742, 283-293.
- Sastre, A., & Reilly, S. (2006). Excitotoxic lesions of the gustatory thalamus eliminate consummatory but not instrumental successive negative contrast in rats. *Behavioural Brain Research*, 170(1), 34-40.
- Sastre, A., Lin, J. Y., & Reilly, S. (2005). Failure to obtain instrumental successive negative contrast in tasks that support consummatory successive negative contrast. *International Journal of Comparative Psychology*, 18(4), 307-319.
- Schutz, S. L., & Bitterman, M. E. (1969). Spaced-trials partial reinforcement and resistance to extinction in the goldfish. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 68(1, Pt1), 126-128.
- Seal, M. F. L., Cuenya, L., Suarez, A. B., & Mustaca, A. E. (2013). Consummatory suppression due to incentive downshift is not a consequence of enhanced search behavior. *Behavioural Processes*, 98, 69-71.
- Sheffield, V. F. (1949). Extinction as a function of partial reinforcement and distribution of practice. *Journal of Experimental Psychology*, 39(4), 511.
- Shettleworth, S. J. (2001). Animal cognition and animal behaviour. *Animal Behaviour*, 61, 277-286.
- Small, D. M., Gregory, M. D., Mak, Y. E., Gitelman, D., Mesulam, M. M., & Parrish, T. (2003). Dissociation of neural representation of intensity and affective valuation in human gustation. *Neuron*, 39(4), 701-711.
- Spear, N. E. y Spitzner, J. H. (1966) Simultaneous and successive contrast effects of reward magnitude in selective learning. *Psychological Monographs: General & Applied*, 80, 10-31.
- Stout, S. C., Muzio, R. N., Boughner, R. L., & Papini, M. R. (2002). Aftereffects of the surprising presentation and omission of appetitive reinforcers on key-pecking performance in pigeons. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 28, 242-256.
- Suárez, A. B., Mustaca, A. E., Pautassi, R. M., & Kamenetzky, G. V. (2014). Ontogeny of consummatory successive negative contrast in rats. *Developmental Psychobiology*, 56(5), 989-998.

- Thompson, M. E., & Thompson, J. P. (1949). Reactive inhibition as a factor in maze learning: II. The role of reactive inhibition in studies of place learning versus response learning. *Journal of Experimental Psychology*, 39(6), 883-891.
- Thorndike, E. L. (1898). Animal intelligence: An experimental study of the associative processes in animals. *The Psychological Review: Monograph Supplements*, 2(4), 1-109.
- Tinklepaugh, O. L. (1928). An experimental study of representative factors in monkeys. *Journal of Comparative Psychology*, 8(3), 197-236.
- Torres, C., & Papini, M. R. (2017). Incentive relativity. In *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*. New York, New York: Springer.
- Wallis, J. D., & Miller, E. K. (2003). From rule to response: neuronal processes in the premotor and prefrontal cortex. *Journal of Neurophysiology*, 90(3), 1790-1806.
- Walton, M. E., Groves, J., Jennings, K. A., Croxson, P. L., Sharp, T., Rushworth, M. F., & Bannerman, D. M. (2009). Comparing the role of the anterior cingulate cortex and 6-hydroxydopamine nucleus accumbens lesions on operant effort-based decision making. *European Journal of Neuroscience*, 29(8), 1678-1691.
- Williams, B. A. (1994). Reinforcement and choice. In N. J. Mackintosh (Ed.), *Animal Learning and Cognition* (pp. 81-108). Academic Press.
- Wingard, J. C., Goodman, J., Leong, K. C., & Packard, M. G. (2015). Differential effects of massed and spaced training on place and response learning: A memory systems perspective. *Behavioural Processes*, 118, 85-89.
- Winter, S., Dieckmann, M., & Schwabe, K. (2009). Dopamine in the prefrontal cortex regulates rat's behavioral flexibility to changing reward value. *Behavioural Brain Research*, 198(1), 206-213.
- Xiao, X., Ding, M., & Zhang, Y. Q. (2021). Role of the anterior cingulate cortex in translational pain research. *Neuroscience Bulletin*, 37(3), 405-422.
- Yang, S., & Tseng, K. Y. (2021). Maturation of corticolimbic functional connectivity during sensitive periods of brain development. In *Sensitive Periods of Brain Development and Preventive Interventions* (pp. 37-53). Cham: Springer International Publishing.