

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

Tesis para optar por el grado de Doctorado

**ONTOGENIA DE LOS EFECTOS PARADÓJICOS DEL
REFORZAMIENTO**

Andrea B. Suárez

Licenciada en Psicología

Dra. Giselle V. Kamenetzky

Directora

Dra. Alba Mustaca

Codirectora

Buenos Aires, Septiembre 2017

***A Bene y Vero
mis modelos constantes
de perseverancia y resiliencia***

ÍNDICE

Agradecimientos.....	4
Resumen.....	6
Introducción.....	8
Metodología general.....	12
Capítulo I. Aprendizaje olfatorio y su influencia en las respuestas de consumo en ratas neonatas.....	22
Capítulo II. Ontogenia de Efectos Paradójicos del Reforzamiento	38
Capítulo III. Relatividad de los Incentivos: teorías y estudios.....	57
Capítulo IV. Respuestas de Reacción al Sabor.....	68
Capítulo V. Establecimiento de Parámetros.....	82
Capítulo VI. Evaluación de los Efectos de CNSc y CPSc en ratas infantiles	92
Capítulo VII. Conclusiones Generales.....	125
Referencias	138
Listado de abreviaturas	164

Agradecimientos

Al comenzar la carrera tenía preconceptos estrechos y limitados de lo que era la Psicología. Sin embargo, vastó cursar *Neurofisiología*, con la cátedra de Alberto Yorio, para comenzar a derribar esas ideas. “Neuro” fue una materia que claramente marcó mi camino, más allá de lo puramente académico. Mi profesora de prácticos, **Judith Garay** fue quien con su entusiasmo por la materia plantó en mí millones de preguntas en lugar de certezas y, sin proponérselo explícitamente, me motivó a descubrir un sentido más amplio de la Psicología. A ella debo agradecer el incentivar mi interés por la investigación y grabar en mi cabeza dos nombres: **Rosario Lores Arnaiz** y **Alba Mustaca**. A partir de ese momento, comenzó un camino a través del cual los conceptos de perseverancia, tolerancia y resiliencia fueron constantes. Al cursar *Metodología de la investigación*, tuve el agrado de asistir a los teóricos de la profesora **Lores Arnaiz**. Me encontré con una mujer totalmente frontal, provocadora y perspicaz e inmediatamente supe que quería formarme en investigación. Me acerqué a ella con la intención de formar parte de su grupo de investigación, pero por cuestiones de logística y espacio no fue posible. Lejos de tomarlo como un obstáculo, lo utilicé como impulso para continuar adelante. Tuvieron que pasar algunos años para toparme con mi segundo referente, **Alba Mustaca**. Al enterarme que se abriría una materia optativa donde ella era titular no dudé ni un segundo en anotarme y poder tener contacto directo. Cuando me acerqué a Alba para plantearle mis intereses, encontré a una persona cálida y muy motivante al saber de mi iniciativa. Sin embargo, con cierto lamento me indicó que su grupo de investigación se encontraba a tope de gente. Debí aguardar hasta el final de la carrera para recibir de forma casi casual un correo electrónico donde se solicitaba pasantes para el laboratorio de Psicología Experimental y Aplicada, a cargo de la Dra Mustaca. ¡Ésta tenía que ser mi oportunidad! Quedé seleccionada entre tres pasantes y de ahí en adelante comencé a formar parte de un hermoso equipo de trabajo.

Considero firmemente que la gran calidad académica y humana que se percibe hasta la actualidad en el PSEA es gracias a **Alba Mustaca**. A ella quiero agradecerle en principio por abrirme las puertas de su laboratorio y

compartir sus conocimientos de igual a igual, añadiendo constantes tintes graciosos y despreocupados. En segundo lugar, por presentarme a **Giselle Kamenetzky** quien, con la humildad de los grandes, fue y es mi luz guía en este camino de la ciencia.

Quiero agradecer,

A **Giselle** por haber sido siempre franca con las circunstancias que conlleva iniciarse en la ciencia en Argentina, por confiar en mí aun cuando yo no lo hacía, por enseñarme que hasta las ideas más locas son posibles de estudiarse rigurosamente, por darme siempre la libertad de elegir, de motivarme, apoyar y acompañarme en cada decisión. Agradezco que no solo sea mi directora sino también una amiga.

A **Ricardo Pautassi** por enseñarme y compartir su saber día a día, haciendo de la distancia un simple detalle, y por confiar en mis capacidades planteándome nuevos desafíos.

A **Mariana Bentosela, Lucas Cuenya, Matías Serafini, Celeste Ifrán, Victoria Dzik, Nadia Justel y Eliana Ruetti** sin cuyas charlas, discusiones, risas, mates y música, estos 7 años de trabajo no hubiesen sido lo mismo.

A **Adriana Jakovcevic, Mariana Psyrdellis y Fernanda González** porque desde que aparecieron en mi vida hacen que el día a día sea simplemente genial. Gracias por impulsarme a desplegar las alas.

A **Yesica Bais, Nadia Bais y Cecilia Cáceres** quienes están desde siempre conmigo, sin importar el tiempo y las distancias.

A **Julián Gianotti**, quien supo sostener mi mano en momentos de oscuridad, alentándome constantemente a seguir adelante y confiar en mí misma.

A **Vero, Lean, Ale y Sol**. Sin ustedes simplemente no podría.

Y especialmente agradezco a mi madre, **Bene**, quien es y será un modelo inigualable de perseverancia y resiliencia. Todos los éxitos que hoy celebro se los debo a su presencia incondicional.

Resumen

La forma en que se responde a los reforzadores está influida no solo por la percepción sensorial de sus atributos (i.e., valor absoluto) sino que también juegan un rol nuestras experiencias previas (i.e., valor relativo). El estudio de estas respuestas durante las primeras etapas de la ontogenia requiere tener en cuenta las características propias de cada etapa y adaptar las metodologías a ellas. En esta tesis se utilizaron dos estrategias para abordar su estudio, en momentos diferentes del desarrollo de la rata. Los experimentos iniciales evaluaron a animales con tres horas de vida. Dada la relevancia biológica que posee el aprendizaje olfatorio en los primeros días de vida de la rata y las capacidades que puede desplegar un neonato, se estudió cómo impacta la presencia de un olor pre-expuesto sobre las respuestas hacia un pezón artificial que contiene una solución apetitiva (Experimentos 1 y 2) o aversiva (Experimentos 3 y 4). Se encontró que la experiencia previa con un olor neutro modificó las respuestas consumatorias hacia una solución moderadamente aversiva, pero no hacia una solución apetitiva. El estudio en animales infantiles (8 a 19 días posnatales) abordó la formación y violación de expectativas sobre diferentes reforzadores. Una estrategia para su evaluación es la utilización de protocolos que impliquen cambios sorprendidos de los reforzadores, tales como el efecto de contraste. Se pueden observar dos tipos, dependiendo de la dirección en la que ocurre el cambio. El *contraste negativo sucesivo* se ve reflejado en un desempeño significativamente peor en un grupo que experimentó el cambio de un reforzador grande por uno pequeño, en comparación con un grupo que siempre recibió la recompensa de menor magnitud. El fenómeno se expresa por una disminución abrupta de la respuesta ante el reforzador devaluado por debajo del grupo control y se considera un índice de frustración. El *contraste positivo sucesivo* consiste en proporcionar al grupo experimental un reforzador grande tras haber experimentado en sucesivos ensayos previos una recompensa pequeña. El efecto se manifiesta en un incremento del desempeño del grupo experimental por encima de un grupo control que siempre recibió el reforzador grande y se considera un índice de euforia. Estos fenómenos se estudiaron ampliamente con animales adultos. Sin embargo, su evaluación en etapas tempranas del

desarrollo ha recibido menor atención. Los Experimentos 5 a 7 permitieron determinar patrones de consumo, las concentraciones de las soluciones de sacarosa que constituyeron los reforzadores grande y pequeño, establecer de la cantidad de ensayos y el tiempo de intervalo entre ensayos. En los Experimentos 8 a 12 se exploró el efecto de contraste devaluando una solución de sacarosa de 12% a 2% (contraste negativo sucesivo – Experimentos 8 a 10), disminuyendo la concentración de 0.1% a 0.01% de quinina (contraste positivo sucesivo – Experimento 12) y presentando de manera sorpresiva sabores dulce y amargo (Experimento 11). Los resultados indican que los efectos de contraste negativo y positivo ocurren a los 18 días de vida de la rata expresándose tanto a nivel de consumo como en las respuestas de reacción al sabor, ante la devaluación de una solución apetitiva (Experimentos 8 y 9) y la devaluación de una solución aversiva (Experimento 12). También se expresa al experimentar el cambio de un sabor a otro (Experimento 11). Asimismo, el aumento de las reacciones aversivas tras experimentar una devaluación de sacarosa (Experimentos 4 y 5) y la disminución del patrón aversivo junto al aumento de las respuestas hedónicas al disminuir la concentración de quinina (Experimento 8) sugieren un cambio en la valoración hedónica hacia estos reforzadores ante el cambio inesperado del sabor. Estos hallazgos constituyen los primeros antecedentes sobre la evaluación de los efectos de contraste negativo y positivo consumatorios en ratas infantiles, reflejando que las conductas mediadas por expectativas emergen durante etapas tempranas del desarrollo. Además, establecen el primer precedente en cuanto al estudio de las respuestas de reacción al sabor emitidas ante cambios sorpresivos de los reforzadores. La consistencia en los datos obtenidos por ambas medidas (consumo y respuestas de reacción al sabor), sugieren que la obtención de un reforzador diferente al esperado, tanto con soluciones apetitivas como aversivas, resulta en una situación lo suficientemente saliente como para impactar sobre la valoración que se realiza sobre los reforzadores. Por lo tanto, los resultados fortalecen las explicaciones que postulan la existencia de un valor relativo de los reforzadores y que destacan los aspectos emocionales en los efectos de contraste.

Introducción

Durante el transcurso de la vida el ser humano se enfrenta a sucesos vitales vinculados con la pérdida inesperada de incentivos materiales o afectivos (e.g., desocupación, muerte de un ser querido, enfermedad, etc.), que provocan reacciones emocionales y cognitivas que interfieren con su funcionamiento biopsicosocial (Mustaca et al., 2009; Mustaca & Papini, 2005). Estas situaciones cotidianas se pueden modelar y estudiar experimentalmente mediante protocolos que impliquen cambios sorpresivos de los reforzadores (Papini & Dudley, 1997). En su conjunto, los fenómenos que surgen de estos protocolos reciben el nombre de Efectos Paradójicos del Reforzamiento (EPR – Amsel, 1992). Esquemáticamente, se podría decir que para su expresión suponen la capacidad para 1. Discriminar entre el valor de las diferentes recompensas, 2. Recordar las recompensas obtenidas con anterioridad, 3. Realizar una comparación entre las recompensas obtenidas previamente y las actuales, 4. Desarrollar expectativas respecto de las recompensas, y 5. Responder de manera diferencial ante los EPR, al compararlos con otros animales que no recibieron estos programas.

En estas respuestas están involucradas reacciones emocionales y cognitivas que se van adquiriendo a medida que el sistema nervioso alcanza diversos estadios de madurez. En ese sentido, cobra interés el estudio de la emergencia de los efectos del aprendizaje a lo largo del desarrollo, puesto que nos permitirá ir infiriendo qué mecanismos son necesarios y suficientes para su existencia. El estudio de la ontogenia de los EPR se abordó principalmente por Amsel y cols. con un protocolo instrumental, mediante el cual estableció que los mismos emergen en forma secuencial. Sin embargo, existe amplia evidencia que la neurobiología de las respuestas instrumentales difiere de las consumatorias (Amsel & Stanton, 1980; Becker, Jarvis, Wagner & Flaherty, 1984; Bentosela, Muzio & Mustaca, 2001; Berdel, Morys & Maciejewska, 1997; Capobianco & Hamilton, 1973; Flaherty & Hamilton, 1971; Flaherty, Coppotelli, Hsu & Otto, 1998; Flaherty, Otto, Hsu & Coppotelli, 1995; Flaherty, Powell & Hamilton, 1979; Flaherty, Rowan, Emerich & Walsh, 1989; Liao & Chuang, 2003; Salina & White, 1998; Sastre & Reilly, 2006).

Por otra parte, estos trabajos resaltan la importancia que tienen nuestras experiencias previas sobre la forma que reaccionamos hacia diferentes reforzadores. Con el objetivo de profundizar en el estudio sobre la valoración de las recompensas, la tesis abordó este tópico en etapas tempranas del desarrollo, teniendo en cuenta características y procesos específicos que tienen lugar en ellas, tal como la existencia de períodos sensibles. Estudios con bebés humanos reportaron que éstos aceptan sabores desagradables hasta alrededor de los 4 meses de vida, mientras que los rechazan si se presentan en edades posteriores (Beauchamp & Mennella, 1996b; 1998a). En la rata se describió un período sensible para el aprendizaje de olores (hasta el día posnatal 10 – DP 10), durante el cual las crías muestran preferencia por un olor aun cuando ha sido previamente asociado a un estímulo aversivo nociceptivo (Moriceau, Roth, Okotoghaide & Sullivan, 2004). La existencia de estos procesos en las primeras etapas de vida, nos invita a pensar nuevas estrategias que permitan evaluar su posible impacto sobre la valoración de reforzadores: ¿cómo evalúan diferentes reforzadores sápidos ratas recién nacidas? Estas evaluaciones ¿pueden ser modificadas en función de experiencias previas con estímulos olfatorios?

El abordaje de estas cuestiones requiere de técnicas y procedimientos adaptados a las características propias de cada etapa de la ontogenia. En esta tesis se implementaron dos procedimientos consumatorios dependiendo de la edad de los animales. Para el estudio de ratas neonatas (3 hs de vida), se utilizó la técnica de pezón artificial que permitió la evaluación de respuestas consumatorias ante diferentes soluciones, en presencia de un olor pre-expuesto (Capítulo I – Experimentos 1 a 4). En ratas infantiles (DP 8 a 19), se utilizó un paradigma de infusión forzada, pero consumo voluntario, que permitió el estudio de algunos EPR (capítulos V y VI – Experimentos 5 a 12) para evaluar si la edad de expresión de los fenómenos consumatorios difiere de los instrumentales. Asimismo, se propuso el registro de respuestas de reacción al sabor como una medida novedosa para la evaluación de procesos emocionales implicados en fenómenos de devaluación del incentivo.

Teniendo en cuenta estos aspectos, la tesis se estructuró de la siguiente manera: En primer lugar, se expusieron los antecedentes sobre fenómenos y procesos presentes en etapas perinatales, así como los trabajos experimentales que se realizaron en ratas neonatas (capítulo I). Luego, se realizó un recorrido por los estudios ontogenéticos de los EPR (capítulo II), las principales teorías y trabajos empíricos sobre los efectos de contraste y la diferencia entre los fenómenos consumatorios e instrumentales (capítulo III) y los estudios que avalan al Test de Reactividad al Sabor (TRS) como un instrumento para medir aspectos hedónicos de la evaluación de los reforzadores (capítulo IV). A continuación, se expusieron los trabajos experimentales que se realizaron en ratas infantiles (capítulos V y VI). Finalmente, se desarrollaron las conclusiones generales que se desprendieron de los estudios empíricos (capítulo VII).

Objetivos e hipótesis

Objetivo general

Estudiar el desarrollo de los procesos de aprendizaje implicados en la valoración de las recompensas en ratas neonatas e infantiles. Aprendizajes complejos como la formación de expectativas que anticipan la aparición de refuerzos de determinada magnitud, la memoria del reforzador recibido en el pasado y su comparación con el presente y las respuestas emocionales que se desencadenan cuando el reforzador recibido es distinto al esperado.

Objetivos específicos:

1. Evaluar si la presencia de un olor pre-expuesto modifica las respuestas consumatorias hacia reforzadores sápidos apetitivos y aversivos en ratas neonatas.
2. Establecer patrones de consumo de diversos reforzadores (e.g., soluciones azucaradas) en ratas pre-destetadas.
3. Estudiar los EPR en ratas infantiles, evaluando respuestas consumatorias como medida dependiente y determinar si los mismos aparecen en estadios más tempranos de la ontogenia que las

asociadas a la anticipación de un refuerzo que se encuentra fuera del contacto directo y que implica la representación cognitiva de éste, como es el caso de los procedimientos instrumentales.

4. Estudiar las respuestas de reacción al sabor que reflejan el valor hedónico de un reforzador, en procedimientos que implican cambios sorpresivos de los reforzadores.

Hipótesis

1. Los animales que hayan sido pre-expuestos a un olor neutro mostrarán un aumento de las respuestas consumatorias hacia un pezón artificial en presencia de dicho olor, en comparación con crías de rata no pre-expuestas.
2. Las ratas que experimenten un cambio sorpresivo del reforzador mostrarán un cambio drástico del porcentaje de ganancia de peso en comparación con los animales del grupo control que reciban el reforzador de menor magnitud en ambas fases del experimento.
3. El CNSc emergerá con anterioridad al CNSi, dado que las áreas cerebrales que subyacen a ambos fenómenos presentan diferentes plazos madurativos (amígdala e hipocampo, respectivamente).
4. El patrón de respuestas de reacción al sabor típico ante un reforzador cambiará luego de experimentar un cambio sorpresivo de la calidad del reforzador.

Metodología general

Protocolo para la evaluación de ratas neonatas

Sujetos

Se utilizaron 165 crías machos y hembras nacidas por cesárea, de 29 hembras Sprague-Dawley (Taconic, Germantown, NY) mantenidas en el bioterio del Departamento de Psicología de la Universidad de Binghamton. Para determinar la preñez, se recogieron los frotis vaginales cada día, durante un periodo de reproducción de 7 días. El primer día de detección de espermatozoides se designó como día embrionario cero (E0) y el día de nacimiento ocurrió en el E21 (DP 0). El bioterio tuvo un ciclo de luz/oscuridad de 12hs/12hs, con las luces encendiendo a las 7 am. La temperatura y humedad se mantuvieron constantes. Todos los animales tuvieron acceso ad libitum a la comida (Purina Rat Chow, Lowell, MA) y agua.

Procedimiento de cesárea

Este procedimiento se llevó a cabo en el E21. Se utilizó isoflurano (Baxter, Deerfield, IL, VetEquip, Pleasanton, CA) para anestésicar a la madre durante la cesárea. Se realizó una incisión en la línea media de la pared abdominal para exponer los cuernos uterinos. Una pequeña incisión en cada saco amniótico permitió la externalización de las crías. El cordón umbilical se presionó durante unos pocos segundos y se cortó. Luego se removieron gentilmente las membranas del cuerpo de las crías con una toalla de papel. Finalmente, cada cría se ubicó dentro de un contenedor plástico (12 cm de largo x 12 cm de ancho x 6 cm de alto) revestido con una gasa estéril humedecida, sobre una almohadilla térmica. Una vez que se completó la cesárea, se sacrificó a la hembra anestesiada.

Aparatos

Incubadoras. El olor se presentó en una incubadora (Microplate Incubator, Boekel Scientific, Feasterville, PA) mantenida a 35°C. Dentro de este aparato se ubicó un macho y una hembra de la misma camada dentro de un envase de plástico hexagonal (4 cm por lado x 2 cm de alto x 5 cm de largo). Los animales pre-expuestos al olor se ubicaron cerca de una tacita con un

hisopo con .1 ml de una esencia de limón (Lorann oils, Inc., Lansing, MI). Los animales no pre-expuestos permanecieron en una incubadora con ningún olor.

Pezón artificial. Se construyó con látex de goma (AMACO rubber latex, Indianapolis, IN) y moldeado sobre una forma cónica de 12 mm de largo con una punta redondeada de 1 mm de diámetro y en la base con 2,5 mm de diámetro. La base del pezón artificial se adjuntó en el final de un explorador dental para facilitar su presentación y la estimulación por parte del experimentador (Petrov, Varlinskaya & Smotherman, 1997). Un tubo de polietileno (Clay Adams, Sparks, MD) se extendía a través del largo del pezón y se adjuntaba a una jeringa que contenía las soluciones. La jeringa contaba con un pequeño agujero en la pared superior para generar un sistema hidráulico. Una ligera presión negativa, producida por las crías al agarrarse del pezón, fue suficiente para extraer voluntariamente los fluidos. A su vez, el pezón artificial contaba con un clip tipo cocodrilo que permitía adjuntar un hisopo y presentar el olor al mismo tiempo de la exposición del pezón. Cada sujeto se colocó en una posición semi-supina dentro de un “chaleco” hecho de goma elástica fina. Esta ligera restricción prevenía los intentos de enderezamientos sin producir molestias ni obstaculizar los movimientos de las crías (ver figura 1).

Soluciones. Las concentraciones de sacarina al 0.1% y 0.015% se prepararon diluyendo 100 mg o 15 mg, respectivamente, en 100 ml de agua destilada. Para preparar las soluciones de quinina al 0.1% y 0.2%, se diluyó 100 mg o 200 mg en 100 ml de agua destilada, respectivamente (Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

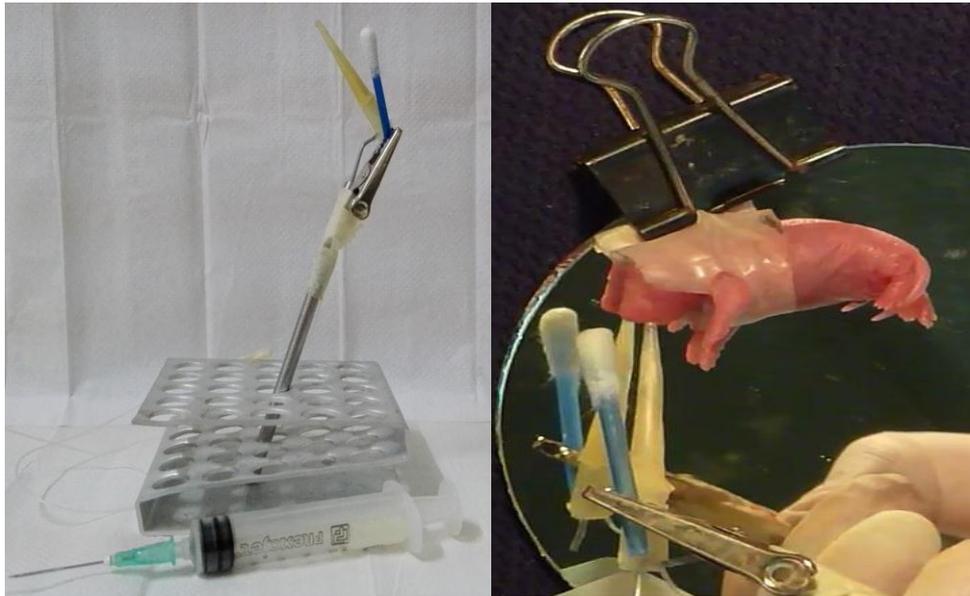


Figura 1. Pezón artificial (izq) y su implementación en la prueba (der).

Procedimiento

Inmediatamente después del nacimiento se ubicó a las crías dentro de las incubadoras (en función de la condición experimental) y se expusieron durante una hora a un hisopo embebido en 0.1 ml de esencia de limón o sin olor. Posteriormente, se ubicaron por 3 (Experimento 1) o 2 hs. (Experimentos 2 a 4) dentro de una incubadora, separadas en función de la exposición al olor para evitar la contaminación cruzada de olores. La prueba comenzó inmediatamente después. Se estimuló a las crías gentilmente en la región ano-genital con un algodón para inducir la micción y la defecación. Posteriormente, se las pesó y las colocó individualmente dentro de la caja de evaluación por 6 min, sobre un espejo mantenido a $35.5^{\circ}\text{C} \pm .5^{\circ}\text{C}$. La evaluación consistió en la presentación de diferentes soluciones proporcionadas a través de un pezón artificial en presencia del olor a limón, estimulando gentilmente con la punta del pezón la zona perioral del sujeto por 6 minutos. Una vez que la respuesta de agarre se realizó, las ratas podían obtener 0.1% o 0.015% de sacarina (Experimentos 1 y 2) o 0.1% o 0.2% de quinina (Experimentos 3 y 4) a través del pezón. Al final de la sesión, se retiró a las crías de la caja de evaluación, se las secó con una toalla de papel, se pesaron y se las devolvió a la incubadora. La respuesta de agarre involucraba un movimiento activo de la cabeza hacia el pezón artificial, el cual resultaba en la punta del pezón entrando en la cavidad

oral con la boca cerrada alrededor de pezón. A partir de esta respuesta se obtuvieron las siguientes medidas: a. latencia de agarre (tiempo transcurrido hasta la primera respuesta de agarre), b. duración de agarre (suma de la duración de todos los agarres realizados), c. frecuencia de agarre y d. duración promedio de cada respuesta de agarre (tiempo total/número de agarres). Finalmente, se calculó el porcentaje de ganancia de peso corporal $\{100 \times [(peso\ pos - peso\ pre)/peso\ pre]\}$ como una estimación del consumo. El orden de evaluación para los diferentes grupos se contrabalanceó a través de los experimentos. Para un ejemplo de este procedimiento ingresar a <https://www.youtube.com/watch?v=nHp4oK6RWCw>.

Tanto durante la exposición al olor como en el intervalo de 2-3 hs., cada animal se mantuvo junto a un compañero de camada y con calor constante para emular las características del nido. Para eliminar una posible confusión de efecto de camada con los del tratamiento, solo un sujeto de cada sexo por camada se asignó a una condición experimental (Holson & Pearce, 1992). Cada condición incluyó un número similar de machos y hembras.

Protocolo para la evaluación de ratas infantiles

Sujetos

Se utilizaron crías de ratas Wistar, obtenidas del bioterio del Instituto de Investigaciones Médicas Dr. Alfredo Lanari (IDIM-CONIET, Argentina). En los experimentos 5, 6, 7, 9 y 11 se usaron hembras mientras que en los restantes, machos y hembras. Esta diferencia entre los experimentos obedeció a aspectos prácticos y de disponibilidad del bioterio. Antecedentes previos indican que el sexo no constituye un factor de variación significativa en los fenómenos bajo análisis en esos experimentos (Chen, Gross & Amsel, 1981; Daniel, Ortega & Papini, 2009; Flaherty et.al., 1979; Wood, Norris, Daniel & Papini, 2008). La edad de las crías varió de acuerdo al objetivo de cada experimento, pero en todos los casos se evaluó a ratas menores a DP 20. El día de parto se consideró como DP 0. Las crías se mantuvieron con sus madres y tuvieron acceso *ad libitum* al agua y comida (Cooperación, Buenos Aires, Argentina). Los entrenamientos se realizaron entre las 8 hs. y las 15 hs.

El cuarto experimental y la habitación donde se alojaron los animales tuvieron un ciclo de luz/oscuridad 12hs/12 hs. (luz de 7 hs. a 19 hs.), con temperatura (22°C) y humedad (60-70%HR) constantes.

Aparatos

Se utilizó una bomba de infusión (APEMA S.A., Buenos Aires, Argentina – figura 2), que contenía 4 a 8 jeringas Prexajet de 5 ml cada una. Éstas contenían la solución a infundir (ver procedimiento de cada experimento, capítulos IV y V). Cada jeringa se conectaba a un tubo de polietileno PE 50 y ésta a su vez a una cánula PE10 (Clay Adams, Parsippany, NJ) colocada previamente en la mejilla del animal. Las cánulas fueron construidas utilizando el calor de un soldador eléctrico con el fin de aplanar uno de sus extremos, el cual quedaba colocado en el interior de la mejilla del animal. Durante el período de privación las crías se mantuvieron en grupo, en cajas de acrílico negro de 24,5 x 20 x 22 cm sobre almohadillas térmicas para mantener la temperatura constante.



Figura 2. Bomba de infusión APEMA

Para la evaluación de los animales se utilizó 2 tipos de cajas, de acuerdo al objetivo del experimento. En los experimentos 4 a 8 se usó cajas de acrílico transparente de 28 x 15 x 15 cm, subdivididas en 4 compartimentos iguales (figura 3). En los experimentos 5 a 8 se evaluó a las crías en cajas espejadas en forma de trapecio (34 cm de frente, 18 cm de fondo y 18 cm de alto – figura 4 y 5), subdivida en 2 compartimientos iguales. Las paredes laterales y del fondo, así como el piso fueron construidas en vidrio espejado. La pared del

frente fue de vidrio transparente y la pared divisoria de los compartimentos que fue de vidrio opaco.



Figura 3. Caja de entrenamiento de acrílico.



Figura 4. Caja de entrenamiento espejada.



Figura 5. Compartimento individual de caja espejada

Procedimiento básico

Tres horas antes de comenzar cada ensayo, las crías se separaron de sus madres y se las canuló a fin de administrar las soluciones dentro de la cavidad oral. La canulación consistió en unir a una aguja de metal (30G C-KJECT, CK Dental Industries, Buenos Aires, Argentina) el extremo libre de la cánula PE10. Luego se la colocó a través de la porción media de la mejilla quedando el extremo aplanado de la cánula dentro de la boca del animal. El procedimiento no requirió más de 10 segundos e indujo un estrés mínimo en el animal (Spear, Specht, Kirstein, & Kuhn, 1989). En cada ensayo se alternó el orden de canulación entre la mejilla izquierda y derecha para preservar el tejido del animal. Durante las 3 hs. de privación las crías permanecieron en grupo de 4 sujetos para minimizar el estrés.

Una vez que transcurrieron las 3 hs. de privación, se estimuló suavemente la zona ano-genital de las crías con un algodón para inducir la micción y/o defecación. A continuación, se registró el peso previo (peso pre) e inmediatamente después, se adosó la cánula PE10 a una cánula PE50 a través de la cual se conducían las soluciones contenidas en las jeringas. Estas estaban adheridas a una bomba de infusión, que se programó para que

infundiera de forma continua durante 10 minutos (i.e., duración de cada ensayo). El volumen total de infusión fue equivalente al 2.5% del peso de cada animal (Pautassi, Arias, Molina & Spear, 2008). Los restantes detalles (e.g., cantidad de ensayos, reforzador utilizado, intervalo entre ensayo) variaron de un experimento a otro de acuerdo al objetivo. Por esta razón, el diseño específico que siguió cada uno se describirá en los capítulos V y VI.

Medidas dependientes

Porcentaje de ganancia de peso. Constituye una estimación del consumo que se obtiene mediante la aplicación de la siguiente fórmula: $(\text{peso post} - \text{peso pre-entrenamiento}) / \text{peso pre-entrenamiento} \times 100$.

Respuestas de reacción al sabor. Se registraron frecuencia y / o duración de las siguientes conductas:

- Mouthing (duración – respuesta apetitiva): movimientos rítmicos de la boca y mandíbula.
- Paw lick (duración – respuesta apetitiva): lameteo de las patas delanteras.
- Head shake (frecuencia – respuesta aversiva): sacudidas rápidas de la cabeza hacia los lados.
- Chin rubbing (frecuencia – respuesta aversiva): frotar la barbilla contra el piso, proyectando el cuerpo hacia adelante.
- Flailing of forelimbs (frecuencia – respuesta aversiva): sacudimiento rápido de las patas delanteras
- Fase wash (frecuencia y duración – respuesta aversiva): movimientos circulares con ambas patas delanteras sobre el hocico.
- Paw tread (frecuencia y duración – respuesta aversiva): movimientos sucesivos de extensión de una de las patas delanteras hacia adelante y contra el piso mientras se retrae la otra hacia atrás.

- Wall climbing (frecuencia y duración – respuesta aversiva): apoyar las patas delanteras sobre la pared, sosteniéndose sobre las patas traseras.

Estas conductas se registraron en los experimentos 8 a 12. El tipo y número de respuesta medidos en cada experimento se detallará en el apartado correspondiente a cada diseño experimental. Para ejemplos de estos comportamientos ingresar a https://www.youtube.com/watch?v=7Zp-MKWxN_c.

Preparación de las soluciones

Para la evaluación en esta etapa ontogenética se utilizaron soluciones de sacarosa y quinina en diferentes concentraciones. Para la sacarosa se usaron las concentraciones 2%, 5%, 10% y 12%. Cada una se obtuvo diluyendo 2, 5, 10 o 12 gr de sacarosa (Ledesma, Argentina) en 100 ml de agua destilada, respectivamente. Para la solución de quinina se utilizaron dos concentraciones: 0.1% y 0.01%. Para la primera solución se pesó 100 mg de quinina, mientras que para la segunda 10 mg (Saporiti S.A.C.I.F.I.A., Buenos Aires, Argentina), las cuales se disolvieron en 100 ml de agua destilada.

Análisis de datos

Los ensayos se grabaron con dos cámaras (Sony, DCR-SR47) para su posterior análisis. El registro y análisis de conductas se realizó utilizando el programa JWatcher (versión 1.0). La confiabilidad inter-observadores fue > 85% para todas las conductas, utilizando la fórmula: $[\text{Total de acuerdos} / (\text{Total de acuerdos} + \text{total de desacuerdos})] * 100$; para frecuencia, y $(\text{Tiempo total menor} / \text{Tiempo total mayor}) * 100$, para duración. En todos los casos se utilizó un procedimiento de simple ciego y dos evaluadores.

Los datos registrados en todos los experimentos se procesaron a través del programa estadístico Statistica versión 8.0, y se analizaron con ANOVAS de factores independientes y de medidas repetidas (Ensayos). Se utilizó el mínimo de animales necesarios para alcanzar un nivel de significación alfa de 0.05. Se realizaron comparaciones múltiples a posteriori con la prueba LSD, para aquellos factores que presentaron diferencias significativas. En los

Experimentos 2 y 3 se llevaron a cabo análisis *t* de Student para muestras independientes, en los cuales el factor de agrupamiento fue la condición de Olor. En algunos casos, guiados por las hipótesis planteadas e independientemente de alcanzar la significancia estadística en el ANOVA, se llevaron a cabo comparaciones planeadas (Aron, Coups & Aron, 2013 – pp. 340-350). Para los experimentos donde se evaluaron ratas neonatas, las hipótesis predicen que los animales pre-expuestos al olor mostrarán mayores respuestas de consumo y agarre a un pezón artificial en presencia de dicho estímulo, en comparación con aquellos no pre-expuestos. En cuanto a los experimentos con ratas infantiles, las hipótesis postulan que los grupos se diferenciarán principalmente en los ensayos 1 y 2 de la fase de poscambio puesto que es el momento donde el efecto de contraste se expresa con fuerza. Asimismo, es esperable que las respuestas de reacción al sabor también varíen en función de experimentar un cambio del reforzador. En los experimentos que se utilizaron sujetos machos y hembras, los datos se colapsaron por sexo dado que este factor no alcanzó la significación estadística en ninguna de las variables.

Capítulo I

Aprendizaje olfatorio y su influencia en las respuestas de consumo en ratas neonatas

Los estímulos olfatorios son críticos durante las etapas tempranas de la vida en los mamíferos. Las especies altriciales están evolutivamente predispuestas a aprender conductas que facilitan la aproximación y apego hacia el cuidador, incluso en el contexto de abuso parental o negligencia (Landers & Sullivan, 2012). Esta predisposición específica de la edad disminuye a medida que los sujetos transitan hacia la adolescencia y adultez, aunque la influencia de los aprendizajes tempranos durante periodos sensibles del desarrollo puede ser de largo término (Dias & Ressler, 2014; Shah, Oxley, Lovic & Fleming, 2001).

Fetos humanos son capaces de detectar estímulos quimio-sensoriales derivados de la dieta materna, a través del líquido amniótico. Además, pueden inhalar líquido amniótico desde la semana gestacional 24 y hacia el final de la gestación ingieren activamente cantidades significativas de este fluido. Estas se consideran las primeras experiencias sensoriales gustativas y olfatorias en humanos (Lipchock, Reed & Mennella, 2011) y pueden resultar en la codificación de memorias asociativas y no asociativas. Por ejemplo, se encontró que bebés de madres quienes ingirieron alcohol o anís durante la gestación mostraron mayores respuestas de orientación hacia esos olores a las pocas horas después del nacimiento e incluso a los 4 días de vida (Molina & Spear, 2001; Schaal, Marlier & Soussignan, 2000).

Después del nacimiento se conforman memorias de largo plazo que probablemente afecten el consumo y los comportamientos de alimentación en etapas posteriores. Las claves quimiosensoriales presentes en la leche materna pueden regular los patrones de succión (Mennella & Beauchamp, 1996a; Mennella, Jagnow & Beauchamp, 2001). La capacidad de respuesta hacia los sabores se ajusta de forma precisa durante la etapa posnatal temprana y cambios drásticos en la sensibilidad hacia los sabores pueden ocurrir en periodos breves de tiempo. Por ejemplo, bebés humanos aceptan

rápidamente hidrolizado de proteínas (i.e., leche de fórmula modificada para prevenir alergias e intolerancia a proteínas en infantes) a los 3-4 meses de edad, a pesar de su sabor desagradable. Sin embargo, lo rechazan enérgicamente cuando se proporciona por primera vez a los 5-6 meses de edad (Beauchamp & Mennella, 1996b; 1998a).

Estudios con animales indican que desde el DP 0 a 10 la rata exhibe un período sensible durante el cual se desarrollan preferencias por olores (Moriceau et. al., 2004). No obstante, el aprendizaje olfatorio continúa a lo largo del periodo de predestete, probablemente permitiendo a las crías ajustarse a los cambios en el olor de la madre y la leche, inducidos por la dieta (Landers & Sullivan, 2012). La reacción de los infantes hacia el olor o gustos de las sustancias disponibles en el contexto de succión promueven mayor contacto con su cuidador, asegurando el acceso a la comida, calor y protección (Nizhnikov, Petrov, Varlinskaya & Spear, 2002; Sullivan, 2003).

Los mecanismos neurobiológicos que soportan el aprendizaje de olor operan de una forma compleja en esta etapa específica del desarrollo. Los olores presentados durante el período sensible, incluso aquellos sin relevancia biológica, híper-estimulan el bulbo olfatorio, el cual a su vez facilita la adquisición del aprendizaje olfatorio (Landers & Sullivan, 2012). A diferencia del aprendizaje olfatorio, la adquisición del miedo condicionado está disminuido durante este periodo del desarrollo. Este fenómeno probablemente esté relacionado a la hipo-responsividad del eje HPA e inmadurez de la amígdala, una de las principales estructuras cerebrales implicadas en los aprendizajes de miedo. Un incremento en los niveles de corticosterona (CORT) luego del DP 10 determina la finalización del periodo sensible en la rata (Upton & Sullivan, 2010), aunque los niveles de CORT basales e inducidos por estrés en ratas de dos o tres semanas de edad son mucho más bajas que en las ratas maduras (ver Pautassi, Nizhnikov & Spear, 2012). La activación de la amígdala y el incremento en la producción de CORT en las ratas está asociada con el comienzo de la locomoción y por lo tanto resulta necesario desarrollar mecanismos protectores, tales como la aversión por el olor de los predadores (Moriceau et al., 2004).

Durante este período sensible las crías mostrarán preferencia por olores, incluso luego de apareamientos del olor con un estímulo aversivo moderado. Se sugirió que esto previene a la cría de adquirir aversión hacia la madre, quien en ocasiones provee - durante el curso de los cuidados maternos - malestar (e.g., mordidas, pisotones). Se ha intentado trasladar estas teorías para explicar casos de abuso infantil, en los cuales a veces se observa apego hacia cuidadores que proveen maltrato o negligencia (Moriceau & Sullivan 2005). Cabe aclarar que, a pesar de esta predisposición para adquirir preferencias por olores, los fetos y neonatos son capaces de adquirir aversiones condicionadas. Por ejemplo, Gemberling y Domjan (1982) encontraron aversión al sabor condicionada en ratas de DP 1, y Stickrod, Kimble y Smotherman, (1982) observaron que fetos expuestos en útero a apareamientos de malestar y un sabor/olor mostraron aversión al sabor/olor cuando se los evaluó al DP 16.

La técnica de pezón artificial contribuyó significativamente al estudio de aprendizajes neonatales tempranos. Ésta emplea un dispositivo confeccionado con látex, hacia el que las ratas recién nacidas pueden agarrarse y prenderse y a través del cual obtienen fluidos que pueden consumir de forma voluntaria. Estas conductas, a su vez, pueden ser moduladas por claves olfatorias, normalmente proveídas por un hisopo olorizado adjuntado al pezón (Petrov et al., 1997). Estudios previos mostraron que la succión e ingesta se redujeron cuando el pezón proveía una solución de quinina o salina, mientras que la sacarina incrementó esas respuestas. Este resultado sugiere que la detección y discriminación de sabores influencia las respuestas de succión desde muy temprano en la vida (Nizhnikov et al., 2002). Otro estudio evaluó la respuesta hacia un pezón artificial que contenía fluidos nutritivos y no nutritivos con diferentes cualidades de sabor en exposiciones repetidas. Se halló que la primera ingesta está regulada por procesos quimiosensoriales, mientras que las siguientes están relacionadas con el valor nutricional de las soluciones (Petrov, Nizhnikov, Kozlov, Varlinskaya, Kramskaya & Spear, 2004).

La técnica del pezón artificial también fue utilizada para estudiar aprendizaje olfatorio en ratas neonatas. Uno de los primeros estudios que empleó dicha técnica indicó que ratas recién nacidas pueden adquirir

condicionamientos olfatorios robustos 3 hs. después del nacimiento, cuando una esencia de limón (estimulo condicionado, EC) se apareó con leche proporcionada por vía intraoral a través de una cánula (estímulo incondicionado, EI). Exposiciones posteriores al EC indujeron un agarre significativo a un pezón artificial vacío (Cheslock, Varlinskaya, Petrov & Spear, 2000). Estudios que emplearon leche como EI en la técnica de pezón mostraron que ratas recién nacidas pueden adquirir aprendizajes asociativos complejos, tales como condicionamiento de segundo orden y precondicionamiento sensorial (Cheslock, Varlinskaya, High & Spear, 2003).

La presentación de olores pre-expuestos también es un factor que modula fuertemente las conductas de agarre a un pezón artificial. Las ratas neonatas muestran mayor cantidad de movimientos de las extremidades y conductas de agarre hacia un pezón artificial olorizado con un olor pre-expuesto (Miller & Spear, 2008, 2009, 2010). Aún se desconoce si un olor familiar puede modular la ingesta de sabores básicos tales como amargo o dulce. Trabajos previos sugieren que la familiaridad con olores o sabores durante periodos sensibles de la ontogenia pueden resultar en un incremento de la succión o un aumento de la aceptación de sabores o comidas en etapas posteriores del desarrollo. Por ejemplo, Domínguez, López y Molina (1998) observaron que ratas Wistar expuestas a propiedades quimiosensoriales del etanol durante los días gestacionales 17-20, mostraron un aumento del consumo de un compuesto de sacarosa-quinina en relación a los controles expuestos a vehículo en útero. Un gran número de estudios (e.g., Kiefer, Coonfield & Ferraro, 2005) sugieren que este sabor emula el sabor del etanol. Apareamientos de un olor novedoso y la administración de alcohol en útero parecen dotar al olor con propiedades reforzantes que incrementan el agarre a un pezón durante las primeras respuestas de succión (Abate, Varlinskaya, Cheslock, Spear & Molina, 2002). Además, las sustancias amargas y agrias son innatamente rechazadas por humanos, aunque este patrón puede ser modificado por exposiciones tempranas a los componentes volátiles de alimentos con tales sabores (Beauchamp & Mennella, 2009). Varias especies mamíferas, entre ellas los humanos y las ratas, despliegan respuestas de disgusto y rechazo ante la presentación de sabores amargos y ácidos, mientras

que ante sabores dulces expresan respuestas de ingesta y aceptación (Berridge, 2000 – ver capítulo IV para una ampliación de este punto).

Puesto que en períodos tempranos del desarrollo los estímulos olfatorios resultan ser clave para la supervivencia ya que guían a la cría hacia el nido y permiten el reconocimiento materno (Moriceau et al., 2004) y se halló que fomentan las respuestas de agarre hacia un pezón artificial (Miller & Spear, 2008, 2009; 2010), ¿La presencia de un olor pre-expuesto incrementará el valor de un reforzador gustativo apetitivo como la sacarina o modificará la forma de valorar un reforzador gustativo aversivo como la quinina?

A continuación, se expondrán 4 experimentos que tuvieron como objetivo abordar esta pregunta. En los Experimentos 1 y 2 se utilizó sacarina, mientras que en los Experimentos 3 y 4 quinina como reforzadores gustativos. En ambos casos, se evaluaron las respuestas de consumo y agarre hacia un pezón artificial que contiene estas soluciones, en presencia de un olor pre-expuesto.

Experimento 1. Respuestas hacia un pezón artificial que provee un sabor dulce (sacarina) en presencia de un olor pre-expuesto.

El objetivo de este experimento fue se evaluar los efectos de la estimulación con un olor familiar pre-expuesto sobre el agarre a un pezón artificial que provee 0.1% o 0.015% de sacarina. Se empleó un diseño factorial 2 (olor pre-expuesto) x 2 (concentración de sacarina). Los detalles del diseño se exponen en la tabla 1.

Grupo	N	Pre-exposición 1 hora	Prueba con pezón artificial 6 min
Sac .1	14	No olor	0.1 % sacarina + olor a limón
	14	Olor a limón	
Sac .015	14	No olor	0.015 % sacarina + olor a limón
	13	Olor a limón	

Tabla 1. Esquema del diseño del Experimento 1.

Resultados. El ANOVA para la duración promedio de agarre al pezón indicó un efecto principal de concentración de sacarina. Los animales mostraron una duración promedio más alta con la solución de sacarina al 0.1%, independientemente de la condición de olor, $F(1, 51) = 5.96, p < .02$ (figura 6). Ni la pre-exposición al olor ni la interacción entre la pre-exposición y la concentración de sacarina alcanzaron la significancia estadística ($p > .05$). El análisis para la duración total de agarre alcanzó una diferencia marginalmente significativa para el efecto de concentración de sacarina, $F(1, 51) = 3.59, p < .06$. No se observaron diferencias para las dos condiciones de olor en términos de porcentaje de ganancia de peso corporal, número de agarres y latencia al primer agarre ($p > .05$).

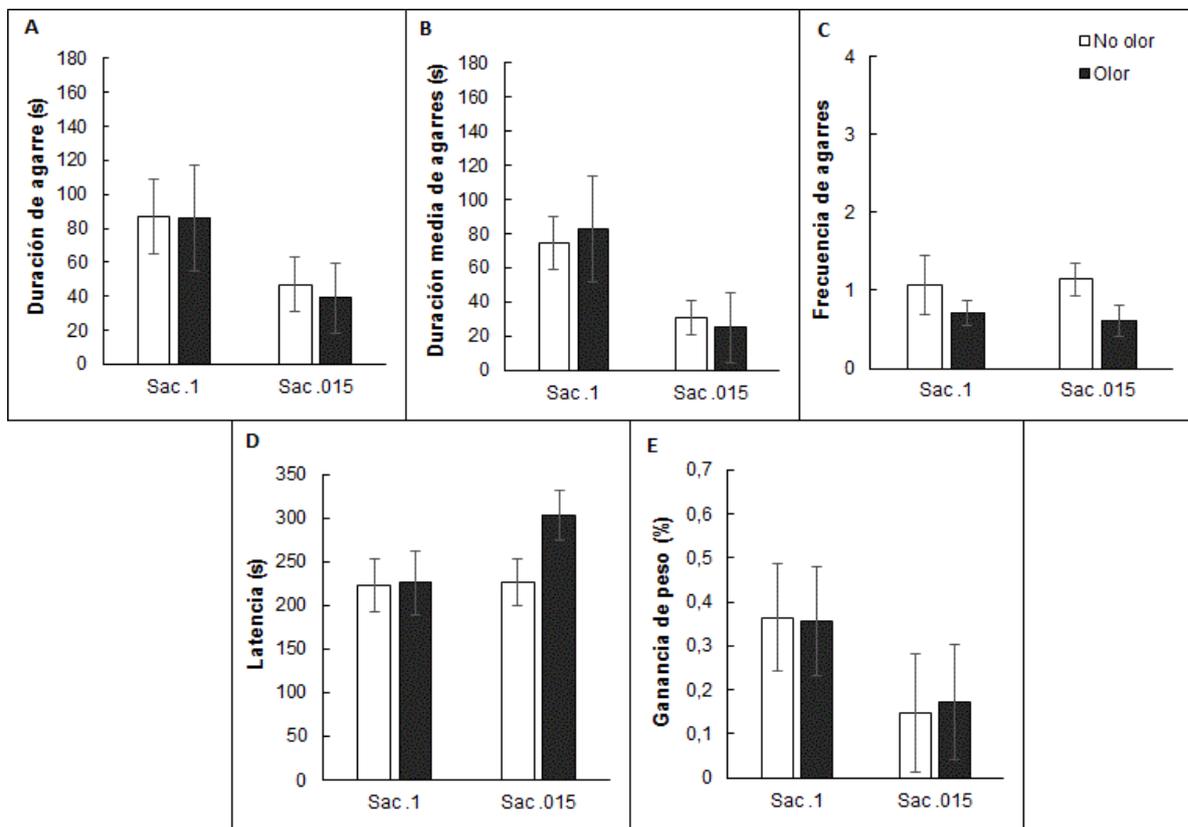


Figura 6. Promedio (\pm ETM) de (A) duración de agarre, (B) duración media de agarres, (C) frecuencia de agarre, (D) latencia y (E) porcentaje de ganancia de peso durante la prueba con el olor a limón y el pezón artificial proporcionando 0.1% (barras izquierdas) o 0.015% de sacarina (barras derechas). Las barras blancas representan al Grupo No pre-expuesto y las barras negras al Grupo Pre-expuesto al olor a limón.

Estos resultados indican que las ratas recién nacidas son capaces de ajustar su conducta de agarre al pezón en función de la magnitud del reforzador recibido. La presencia de un olor pre-expuesto no modificó el consumo ni la intensidad de las respuestas de agarre al pezón artificial, lo cual sugiere que bajo estos parámetros un olor pre-expuesto no modifica la valoración de un reforzador apetitivo.

Experimento 2. Respuestas hacia un pezón artificial que provee un sabor dulce en presencia de un olor pre-expuesto con un intervalo más breve entre la pre-exposición y la evaluación

En el Experimento 2 se replicó el procedimiento del Experimento 1 pero se usó un intervalo más corto (i.e., 2 en lugar de 3 hs.) entre la pre-exposición y la evaluación, las crías se expusieron solo a 0.1% de sacarina en la evaluación. Esta concentración se eligió dado que alcanzó una respuesta más robusta en el experimento previo. Los detalles del diseño se exponen en la tabla 2.

Grupo	N	Pre-exposición 1 hora	Prueba con pezón artificial 6 min
Sac .1	9	No olor	0.1 % sacarina + Olor a limón
	10	Olor a limón	

Tabla 2. Esquema del diseño del Experimento 2.

Resultados. Las ratas pre-expuestas al limón no difirieron estadísticamente de las crías no pre-expuestas en cuanto a la ganancia de peso corporal, tiempo total de agarre, duración promedio, número de agarres y latencia ($p > .05$ – figura 7). Este experimento confirma que la exposición a un olor familiar no altera las respuestas de agarre o consumo ante un pezón artificial que provee un sabor dulce (apetitivo).

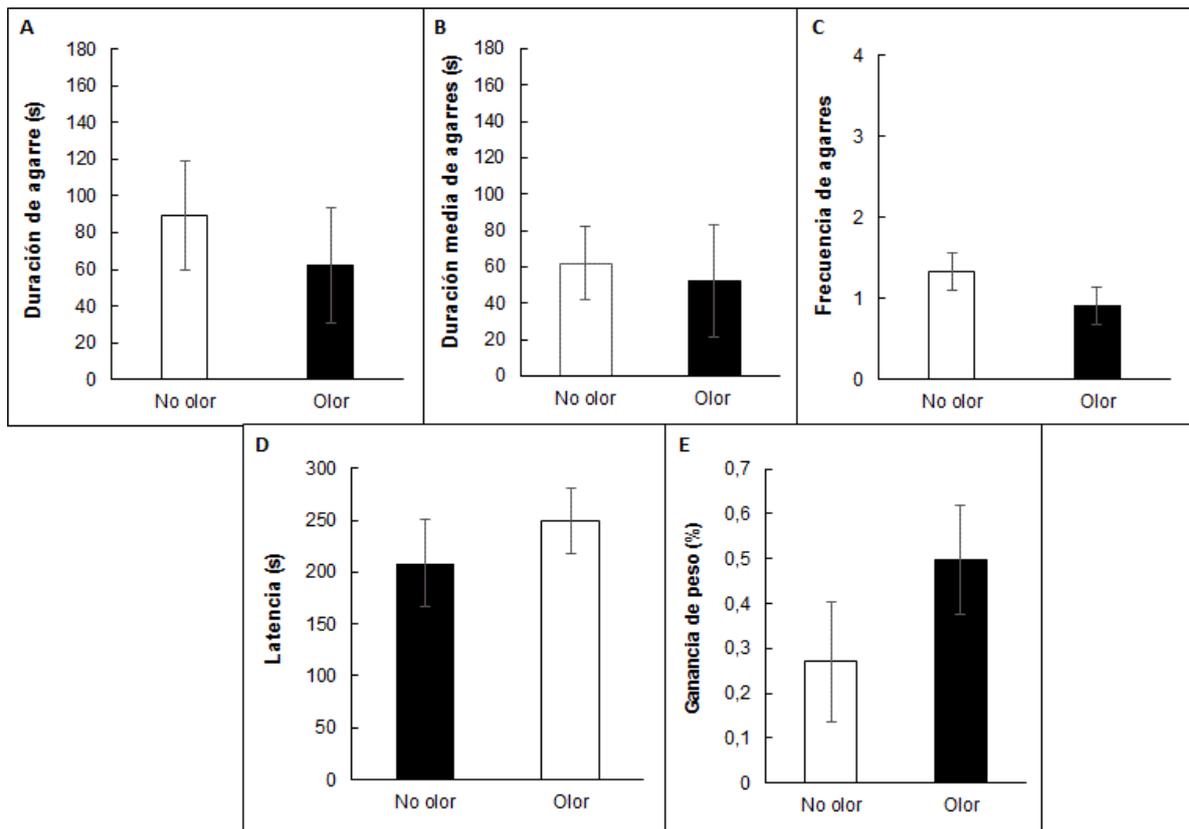


Figura 7. Promedio (\pm ETM) de (A) duración de agarre, (B) duración media de agarre, (C) frecuencia de agarre, (D) latencia y (E) porcentaje de ganancia de peso durante la prueba con el olor a limón y el pezón artificial proporcionando 0.1% de sacarina. Las barras blancas representan al Grupo No pre-expuesto y las barras negras al Grupo Pre-expuesto al olor a limón.

Experimento 3. Respuestas hacia un pezón artificial que provee un sabor amargo en presencia de un olor pre-expuesto

En el Experimento 3, se evaluaron las conductas de agarre y consumo en presencia de un olor pre-expuesto con un pezón proporcionando una solución aversiva, con sabor amargo (i.e., quinina). Los estudios con ratas recién nacidas reportaron menores respuestas de agarre e ingesta hacia un pezón cuando se utiliza una solución de quinina, en comparación a una solución de sacarina o agua (Nizhnikov et al., 2002), un resultado que sugiere que la quinina induce un estado hedónico aversivo. Por otra parte, la estimulación de la lengua con quinina provoca confiablemente reacciones de disgusto en diferentes especies, incluyendo a la rata (Berridge, 2000; Grill & Norgren, 1978a). El objetivo de este experimento fue evaluar si la pre-

exposición a un olor incrementa el consumo y las respuestas de agarre hacia un pezón artificial que contiene quinina, en ratas recién nacidas. El intervalo entre la finalización de la exposición al olor y la evaluación fue de 2 hs. Los detalles del diseño se exponen en la tabla 3.

Grupo	N	Pre-exposición 1 hora	Prueba con pezón artificial 6 min
Qui .1	18	No olor	0.1 % quinina + Olor a limón
	17	Olor a limón	

Tabla 3. Esquema del diseño del Experimento 3

Resultados. La figura 8 muestra la latencia al primer agarre, frecuencia, tiempo total de agarre, duración promedio de agarre y porcentaje de ganancia de peso durante la evaluación. Al parecer la pre-exposición facilitó significativamente la aproximación y contacto con el pezón y tuvo un efecto facilitador sobre el consumo de quinina. El análisis estadístico apoya estas observaciones. Los sujetos pre-expuestos a un estímulo olfativo mostraron, comparados a los animales no pre-expuestos, mayor porcentaje de ganancia de peso, $t(33) = 3.73$, $p < .0007$; tiempo total de agarre, $t(33) = 6.12$, $p < .000001$; frecuencia de agarre, $t(33) = 3.70$, $p < .0008$; duración promedio de agarre, $t(33) = 5.02$, $p < .00002$ y latencia al primer agarre, $t(33) = -3.98$, $p < .0004$.

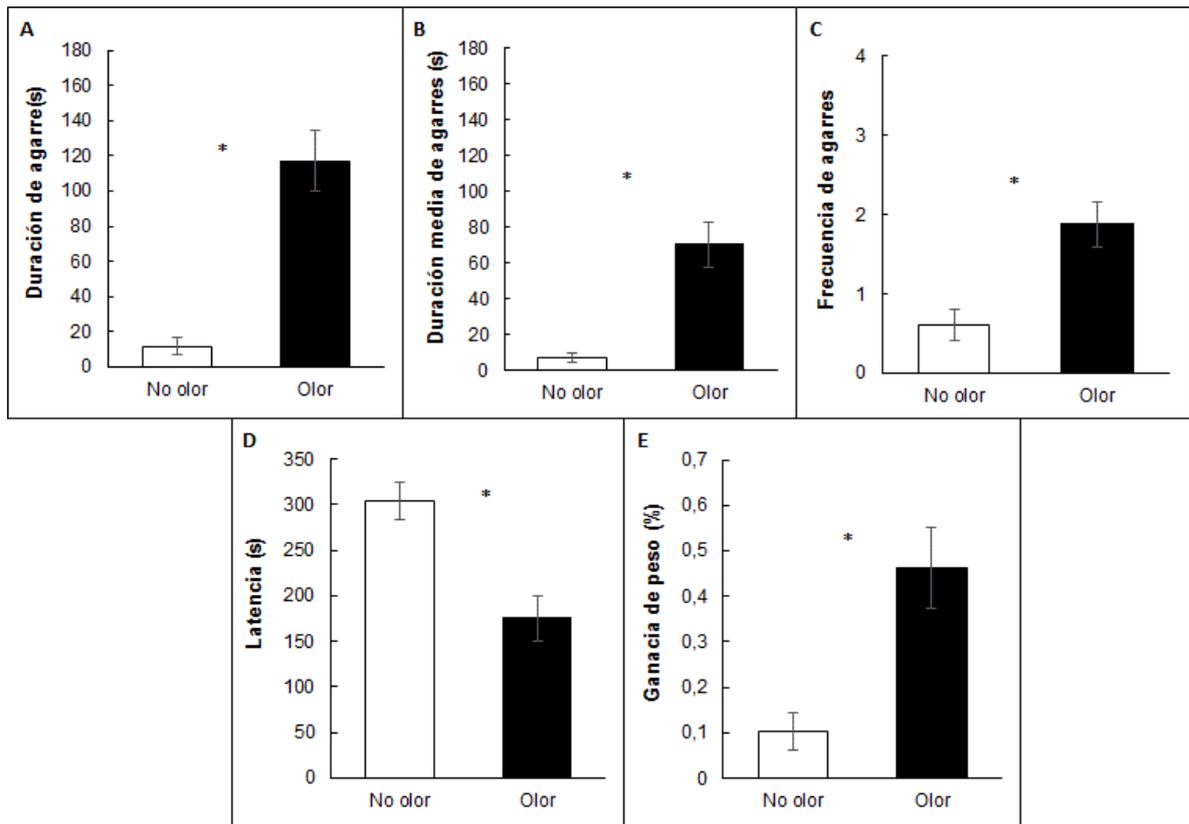


Figura 8. Promedio (\pm ETM) de (A) duración de agarre, (B) duración media de agarre, (C) frecuencia de agarre, (D) latencia y (E) porcentaje de ganancia de peso durante la prueba con el olor a limón y el pezón artificial proporcionando 0.1% de quinina. Las barras blancas representan al Grupo No pre-expuesto y las barras negras al Grupo Pre-expuesto al olor a limón. * $p < .05$.

En resumen, un olor pre-expuesto incrementa la búsqueda e ingesta de una solución aversiva, tal como 0.1% de quinina. Estos resultados sugieren que el olor pre-expuesto pudo haber producido un cambio en el valor hedónico de una recompensa aversiva.

Experimento 4. Respuestas a un pezón artificial que provee una solución amarga en presencia de un olor pre-expuesto: explorando los límites del efecto

Los experimentos previos indican que el olor a limón, que ha devenido familiar por pre-exposición, incrementó la búsqueda y aceptación de quinina, presumiblemente mediante la alteración del valor hedónico de este sabor amargo. El Experimento 4 evaluó los límites de este efecto incrementando la concentración de quinina y por lo tanto su aversividad. De este modo, la

evaluación se realizó usando 0.1% o 0.2% de quinina, en 4 grupos independientes: Olor-qui .1, No Olor-qui .1, Olor-qui .2 y No Olor-qui .2. Los detalles del diseño se resumen en la tabla 12.

Grupo	N	Pre-exposición 1 hora	Prueba con pezón artificial 6 min
Qui .1	14	No olor	0.1 % quinina + olor a limón
	14	Olor a limón	
Qui .2	14	No olor	0.2 % quinina + Olor a limón
	11	Olor a limón	

Tabla 4. Esquema del diseño del Experimento 4

Resultados. Como se ilustra en la figura 9, la pre-exposición al olor a limón incrementó los comportamientos de búsqueda de quinina en la mayoría de las medidas, aunque solo en los animales que recibieron la concentración más baja de quinina. Para el tiempo total de agarre, el ANOVA alcanzó la significación estadística para los efectos principales Exposición al Olor, $F(1, 49) = 11.97, p < .001$, Concentración de Quinina, $F(1, 49) = 19.32, p < .00006$ y la interacción entre ambos factores, $F(1, 49) = 11.65, p < .001$. Evaluaciones post hoc revelaron que el Grupo Olor-qui .1 se agarró por más tiempo al pezón artificial que los grupos Olor-qui .2 ($p < .00001$), No olor-qui .1 ($p < .00001$) y No Olor-qui .2 ($p < .00001$). Aunque el análisis estadístico para la medida de frecuencia reveló un efecto principal de Concentración de Quinina, $F(1, 49) = 4.66, p < .03$, la pre-exposición al olor fue efectiva solo para los animales que recibieron 0.1 % de quinina, $F(1, 27) = 4.19, p < .05$, como lo revelaron las comparaciones planeadas. De forma similar, el análisis de la latencia reveló un efecto principal de Exposición al Olor, $F(1, 49) = 5.92, p < .02$, y Concentración de Quinina, $F(1, 49) = 11.09, p < .002$. Las comparaciones planeadas arrojaron diferencias significativas entre los grupos Olor-qui .1 y No Olor-qui .1, $F(1, 27) = 8.81, p < .006$. El análisis de la duración promedio de agarre reveló un efecto principal de Exposición al Olor, $F(1, 49) = 5.56, p < .02$, Concentración de Quinina, $F(1, 49) = 11.05, p < .002$, y una interacción significativa entre

Exposición al Olor y Concentración de Quinina, $F(1, 49) = 5.17, p < .03$. Análisis post hoc revelaron que el Grupo Olor-qui .1 difiere del Grupo Olor-qui .2 ($p < .0004$), No Olor-qui .1 ($p < .001$) y No Olor-qui .2 ($p < .0001$). El ANOVA para el porcentaje de ganancia de peso arrojó un efecto principal de Concentración de Quinina, $F(1, 49) = 4.04, p < .05$. Los animales que recibieron 0.1% de solución de quinina mostraron un porcentaje de ganancia de peso significativamente mayor que las crías que recibieron 0.2% de quinina.

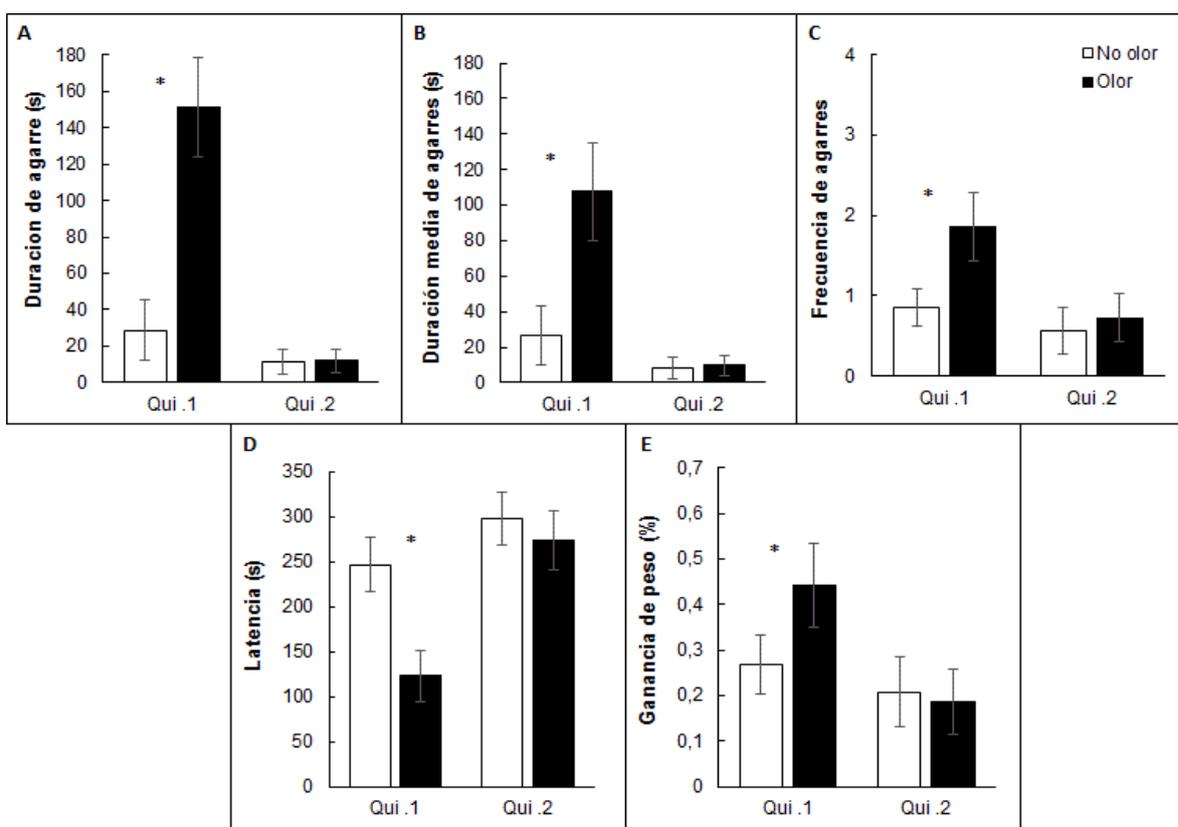


Figura 9. Promedio (\pm ETM) de (A) duración de agarre, (B) duración media de agarre, (C) frecuencia de agarre, (D) latencia y (E) porcentaje de ganancia de peso durante la prueba con el olor a limón y el pezón artificial proporcionando 0.1% (barras izquierdas) o 0.2% de quinina (barras derechas). Las barras blancas representan al Grupo No pre-expuesto y las barras negras al Grupo Pre-expuesto al olor a limón. * $p < .05$.

Estos resultados replican los encontrados en el Experimento 3 y sugiere que la pre-exposición al olor a limón no es efectiva para promover la subsecuente búsqueda e ingesta de quinina cuando se incrementa la intensidad de una solución aversiva.

Discusión general

Las especies altriciales cuentan con mecanismos que facilitan los procesos de apego de la cría a través de una gran plasticidad del aprendizaje del olor materno. Puesto que el olor de la madre cambia de acuerdo a la dieta y las ratas neonatas nacen sin los sistemas visual y auditivo completamente desarrollados, tal plasticidad en el aprendizaje de olores permite a las crías encontrar el nido y el pezón materno a través del olor (Pedersen, Williams & Blass, 1982). Durante el periodo sensible, que se extiende hasta el décimo día de vida de la rata, la facilitación en el aprendizaje de olores se produce tanto hacia olores maternos como neutros (Lander & Sullivan, 2012). En este estudio, las ratas se expusieron a un olor neutro (i.e., olor a limón) inmediatamente después del nacimiento.

Existe controversia en la literatura con respecto a la capacidad de las ratas para reconocer sabores en etapas tempranas del desarrollo. Aunque la literatura previa sugiere que las ratas no detectan el sabor amargo hasta el DP 10-12, puesto que las papilas gustativas no se encuentran funcionalmente maduras hasta esa edad (Hall & Bryan, 1981; Hill, Bradley & Mistretta, 1983; Schwartz & Grill, 1985), vasta evidencia refleja que ratas recién nacidas detectan y discriminan varios sabores, lo cual se evidencia en su capacidad para responder diferencialmente a ellos (Kozlov, Petrov, Varlinskaya, & Spear, 2006; Nizhnikov et al., 2002). También reaccionan diferencialmente a soluciones con diversas cualidades nutricionales (Petrov et al., 2004) y adquieren asociaciones complejas derivadas del condicionamiento de primer y segundo orden, así como de preparaciones de pre-condicionamiento sensorial (Cheslock et al., 2003; Cheslock et al., 2000).

Este trabajo también muestra que poco después del nacimiento las ratas responden diferencialmente entre concentraciones de sacarina y concentraciones de quinina. Al proporcionarles una concentración mayor de sacarina hubo un incremento en la duración y duración media de agarre al pezón, en comparación con animales que reciben una concentración menor, más allá de la condición de pre-exposición al olor. En conjunto, estos antecedentes muestran que el comportamiento de ingesta de las ratas recién

nacidas involucra mecanismos sofisticados de detección del sabor. El resultado más sorprendente de esta serie de experimentos es que en presencia de un olor pre-expuesto las crías incrementan la ingesta y las respuestas de agarre a un pezón artificial que contiene quinina, la cual se considera una solución aversiva (Berridge, 2000). Los animales pre-expuestos al olor mostraron mayor porcentaje de ganancia de peso y conductas de agarre, así como una disminución en la latencia al primer agarre hacia un pezón, en comparación a los animales del grupo control no pre-expuesto. Este patrón de respuestas opuesto al típicamente suscitado por sabores amargos podría sugerir un cambio en la valoración hedónica hacia este reforzador (Berridge, 2000). Además, que tal fenómeno acontezca en presencia de un olor pre-expuesto, advierte sobre la importancia de considerar los estímulos olfativos en el estudio de la valoración de los reforzadores en la etapa perinatal.

No obstante, un punto importante fue la ausencia de un grupo pre-expuesto al limón justo después del nacimiento, pero evaluado sin la presencia del olor. Este control adicional podría haber ayudado a descartar explicaciones alternativas relacionadas a cambios en el comportamiento no específicos debido a la mera pre-exposición. La adición de un grupo de animales pre-expuestos al limón y evaluados bajo un olor diferente pero similarmente saliente, podría haber ayudado también a entender la generalización del fenómeno bajo análisis. Otro control útil podría haber sido evaluar a animales que recibieran agua en presencia del olor pre-expuesto. Esta condición podría haber ayudado a descartar la posibilidad de que el aumento de las respuestas apetitivas se haya emitido gracias a la mera exposición al olor. Esta posibilidad, sin embargo, parece improbable cuando se considera que el olor pre-expuesto no afectó la búsqueda e ingesta de sacarina, ni la capacidad de respuesta hacia la concentración más alta de quinina.

El experimento 4 evaluó los límites del fenómeno de pre-exposición al olor. La facilitación de búsqueda y consumo de quinina ocurrió con una concentración moderada (i.e., 0.1%) pero no con una solución más concentrada (i.e., 2% de quinina). Trabajos previos indican que experiencias con estímulos quimio-sensoriales producen un cambio en las respuestas hacia

estímulos de la misma modalidad sensorial (Miller & Spear, 2009; Molina & Chotro, 1991). La nueva información proporcionada por estos estudios es que un estímulo olfatorio, que deviene familiar por pre-exposición, incrementó el consumo de una solución con sabor aversivo. El efecto no ocurrió cuando el pezón proveía un estímulo apetitivo (Experimentos 1 y 2).

Los resultados no se pueden explicar por mera familiaridad con el estímulo. Los grupos que recibieron sacarina y fueron pre-expuestos al olor no mostraron un incremento en sus respuestas, aunque la posibilidad de un efecto de techo funcional no se puede descartar. No obstante, si se comparan visualmente las figuras 7 (i.e., evaluación con sacarina) y 8 (i.e., evaluación con quinina), puede observarse que la respuesta hacia la quinina excedió a la de la concentración más alta de sacarina en casi todas las medidas, sugiriendo que un efecto de techo no es una posibilidad altamente plausible. Además, la concentración moderada y más fuerte de quinina por si mismas produjeron una ingesta y respuestas de agarre mínimas. Al parecer, para que acontezca este incremento exacerbado en el comportamiento, deben ocurrir dos condiciones: pre-exposición al olor y posteriormente el olor tiene que presentarse junto con un sabor aversivo, en este caso, la quinina. Estos resultados indicarían que la pre-exposición a un olor produce un efecto de facilitación de la ingesta frente a soluciones aversivas, o podría reflejar un proceso asociativo. Esta es la primera evidencia de tal fenómeno, y se necesitan de futuras investigaciones para revelar los mecanismos implicados. Una posibilidad para abordar esta cuestión es la utilización de un segundo olor en la fase de pre-exposición o en la fase de prueba. Esto permitiría evaluar si los resultados obtenidos obedecen a procesos de especificidad hacia el olor o generalización hacia otros olores. Futuros estudios deberían elucidar asimismo los mecanismos psicológicos implicados en la detección de sabores y la interacción de los sentidos del gusto y el olfato durante la temprana ontogenia de la rata.

Estos resultados se relacionan con estudios realizados en infantes humanos. Los bebés humanos parecen mostrar un periodo sensible, antes de los 4 meses de edad, durante el cual aceptan soluciones típicamente rechazadas. Por ejemplo, las leches de fórmula de hidrolizado de proteínas

(PHFs) son extremadamente desagradables comparadas con fórmulas basadas en leche de vaca (CMFs) debido a sus componentes de sabor amargo y ácido. Los infantes mostraron una mayor aceptación de PHFs a edades menores a 3.5 meses (Mennella, Lukasewycz, Castor & Beauchamp, 2011). Desde los 4 meses de edad y hasta la adultez, la PHF se rechaza a menos que el sujeto haya estado expuesto a esta fórmula durante la vida temprana. Otros problemas relacionados, pero importantes, que podrían abordarse con el modelo propuesto son la aceptación de medicinas o alimentos desagradables durante la primera infancia. El sabor desagradable de los remedios puede causar que los bebés los rechacen y dar lugar a deficiencias de dosis, que en algunos casos puede poner en peligro la vida (Mennella & Beauchamp, 2008). De forma similar, alimentos saludables como los vegetales usualmente se rechazan debido a su sabor amargo (e.g., brócoli). La comida que se consume durante la niñez generalmente se acepta en etapas posteriores del desarrollo y esos hábitos generados en etapas tempranas contribuyen a la salud individual. Varias enfermedades se asocian con una dieta poco saludable, tales como la obesidad y diabetes (Beauchamp & Mennella, 2011). Las investigaciones con modelos animales, que consideran asociaciones específicas de sabores y olores, pueden ayudar a desarrollar técnicas para lograr la aceptación de medicamentos no palatables en poblaciones pediátricas, así como con alimentos con sabores amargos.

La rata recién nacida representa un modelo neurológico del humano en el tercer trimestre de gestación, por lo que esta preparación podría ser un modelo animal de comportamientos de ingesta y factores que modulan esas conductas en infantes prematuros (Petrov et al., 2004). Se necesitan más investigaciones para determinar si este es un modelo animal adecuado para estudiar este fenómeno con bebés humanos, pero estos primeros resultados proporcionan vías fructíferas para abordar la ontogenia de las respuestas de ingesta hacia estímulos gustativos aversivos y la acción conjunta de los sistemas olfatorio y gustativo durante el desarrollo temprano.

Capítulo II

Ontogenia de Efectos Paradójicos del Reforzamiento

Los Efectos Paradójicos del Reforzamiento (EPR) constituyen un conjunto de fenómenos del aprendizaje que se caracterizan por cambios de una respuesta aprendida bajo la presentación de distintos programas de reforzamiento (Amsel, 1958; 1992; Amsel & Stanton, 1980). Por ejemplo, en el Efecto de Reforzamiento Parcial en la Extinción (ERPE) un grupo de animales que recibió reforzamiento en el 50 % de los ensayos de la fase de adquisición, mostrará una mayor persistencia durante la fase de extinción, comparado con otro grupo que recibió reforzamiento continuo (i.e., al 100%) en la primera fase. El hecho de observar que se responde más cuando se recibió menos y, a la inversa, se responde menos cuando se obtuvo más, es una de las razones por la que estos efectos reciben el calificativo de “paradójicos”. Tales fenómenos contradicen la “Ley del Efecto” de Thorndike (1898, 1911) y las teorías más tradicionales del aprendizaje (Amsel, 1992; Amsel, & Stanton, 1980; Estes, 1950; Hull, 1943; Rescorla & Wagner, 1972). El conjunto de estos antecedentes teóricos postula modelos lineales de ejecución, al considerar que el decremento en una respuesta es inverso al incremento de la misma, es decir que una curva de extinción adoptaría la misma forma que la de adquisición, pero en sentido inverso.

Si bien el estudio de los EPR es relevante en todos los estadios del desarrollo (tanto tempranos como en la adultez), en términos generales es en los estadios tempranos en donde se forman memorias que afectan las conductas de los individuos en etapas posteriores, incluyendo su estado adulto. Así, los animales regulan su comportamiento no solamente en función de los estímulos relevantes del medio ambiente y de su aprendizaje previo, sino también de las expectativas que se formaron a lo largo del mismo. Por ejemplo, si un estudiante dedicó poco tiempo al estudio probablemente no experimentará respuestas de frustración si el profesor lo aplaza; en cambio otro que espera obtener una calificación alta, tendrá una reacción negativa si recibe un aplazo. Esta regulación emocional del aprendizaje, o de las reacciones a los

estímulos involucrados en este último, está asociada a la integridad o la activación funcional de distintas estructuras neurales (tanto en el sistema límbico como en la corteza frontal, entre otras; para una descripción detallada ver Amsel, 1992; Ortega, Glueck, Uhelski, Fuchs & Papini, 2011; Ortega, Uhelski, Fuchs & Papini, 2013; Papini, Fuchs & Torres, 2015). Por esta razón, el estudio de los EPR, generalmente, se vale del uso de protocolos con ensayos espaciados para garantizar que su expresión obedece a aprendizajes con base neural y no a procesos sensoriales (Weinstock, 1954, 1958). Una forma de acceder al conocimiento de los mecanismos implicados en los EPR es evaluar su aparición en la filogenia y en la ontogenia y establecer qué estructuras cerebrales están implicadas. Asimismo, el estudio de este tipo de fenómenos en diferentes momentos de la ontogenia puede arrojar luz sobre cómo pueden afectar o interactuar nuestros aprendizajes tempranos en etapas posteriores del desarrollo. En trabajos donde se evaluaron aprendizajes tempranos sugieren que experiencias con olores modulan comportamientos maternos (Shah et. al., 2001) en la adultez, e incluso tienen incidencia en generaciones sucesivas al inducir cambios genéticos (Dias & Ressler, 2014). De forma similar ocurre con los sabores, el contacto perinatal con estímulos gustativos afecta los patrones de consumo y preferencia hacia esos sabores en etapas posteriores del desarrollo (Beauchamp & Mennella, 2011; Faas, March, Moya & Molina, 2015; Hannigan, Chiodo, Sokol, Janisse & Delaney-Black, 2015; Mennella & Beauchamp, 1991, 1993, 1997, 1998a). En este contexto, la evaluación ontogenética de los EPR podría revestir importancia en el estudio sobre la capacidad de resiliencia en etapas posteriores.

Amsel fue pionero, durante las décadas de 1970 y 1980, en el estudio de la ontogenia de los EPR en la rata. Utilizó un corredor recto adaptado a la edad de los animales, mediante el cual medía la respuesta instrumental de aproximación a la caja meta. Durante las dos primeras semanas de vida, la recompensa consistía en la posibilidad de succionar de los pezones de una hembra anestesiada. La succión podía ser *con liberación de leche* o *seca*. En el primer caso, una vez que la cría se prendía al pezón, se le infundía pulsos de leche dentro de la boca por medio de una cánula. En el segundo caso, el animal también estaba canulado, pero al succionar del pezón no obtenía la

infusión de leche. Ambos casos se consideraron como recompensas grande y pequeña, respectivamente, ya que si bien durante la succión seca la cría no recibe un reforzador nutritivo (e.g., leche), el tener contacto con la hembra constituye en sí mismo un reforzador apetitivo pero de menor magnitud (Amsel, Burdette & Letz, 1976; Amsel, Letz & Burdette, 1977; Hall, Cramer, & Blass, 1977; Letz, Burdette, Gregg, Kittrell & Amsel, 1978). En otras investigaciones, a medida que la edad de las crías iba en aumento, utilizaba leche en un recipiente o alimento sólido como reforzadores en caja meta del corredor recto (Amsel, 1992).

Utilizando estos procedimientos, Amsel llevó a cabo estudios para evaluar la expresión del condicionamiento clásico e instrumental durante las primeras semanas de vida de la rata. Los resultados de sus trabajos muestran que hay un orden secuencial de aparición de tales efectos desde los fenómenos de condicionamiento clásico e instrumental hasta los EPR. A su vez, estos últimos también emergen gradualmente conforme los sujetos crecen. A continuación, se hará un recorrido por estos trabajos teniendo como eje el orden de aparición de los efectos estipulado por Amsel (1992).

Aversión al sabor. El protocolo típico para evaluar aversión al sabor consiste en dar acceso a una solución generalmente dulce (e.g., sacarosa), seguido inmediatamente por la inducción de malestar gástrico, por ejemplo, mediante una inyección de cloruro de litio (LiCl). Posteriormente se evalúa el consumo voluntario del reforzador y, usualmente, se observa una disminución significativa en el consumo del mismo, lo que se atribuye a que se ha convertido en una señal del malestar (Garcia & Koelling, 1966).

Gemberling, Domjan y Amsel (1980) y Gregg y cols. (1978) evaluaron el aprendizaje de aversión al sabor en ratas de DP 5, 12 y 15. La metodología utilizada consistió en realizar un apareamiento entre el consumo de una solución de sacarina, provista por vía intraoral y una inyección de LiCl. Entre ambos estímulos podían mediar 0 minutos, 2-3 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos. A las 12 hs. se expuso nuevamente a las crías a la solución de sacarina y se halló, en todas las edades, una evitación condicionada hacia la sacarina, que se retenía por más de 12 hs. No obstante,

la expresión del aprendizaje de aversión se vió afectada por la cantidad de tiempo debió transcurrir entre la exposición a la sacarina y la aplicación del LiCl y la edad de la cría. Por ejemplo, al DP 15, tras un intervalo de 2 hs. la aversión aún es evidente. Sin embargo, al DP 5 y 12 basta con un intervalo mayor a 30 minutos para que el fenómeno no se exprese. Estos resultados cuestionarían las interpretaciones de la época, las cuales afirmaban que el hipocampo cumple un papel importante en las respuestas de inhibición, ya que éste se encuentra morfológicamente inmaduro a las edades de las ratas estudiadas (Amsel & Stanton, 1980).

Adquisición y Extinción instrumental tradicionales. Este fenómeno constituye un aprendizaje “no paradójico” (Amsel, 1992; Amsel & Stanton, 1980) en el que, una vez que la conducta operante se estabiliza, le sigue una fase de extinción caracterizada por la ausencia de reforzamiento y la consecuente disminución de la respuesta instrumental previamente aprendida.

Amsel y cols (1976) ubican la emergencia de este fenómeno alrededor del DP 10. Durante la fase de adquisición, las crías tuvieron la posibilidad de acceder por 15 segundos a una *succión seca* al llegar a la caja meta del corredor recto, mientras que en los ensayos de extinción se encontraban con la ausencia de la hembra. Se halló que la velocidad de recorrido fue significativamente menor durante los ensayos recompensados (i.e., adquisición) en relación a los no recompensados (i.e., extinción), dando cuenta que al DP 10 las crías son capaces de aprender una respuesta instrumental apetitiva e inhibir la misma ante la omisión de una recompensa.

Una explicación alternativa a los resultados obtenidos previamente sugiere que el desempeño de las crías podría deberse a la presencia y ausencia de claves olfativas familiares y relevantes durante las fases de adquisición y extinción, respectivamente. Con el objetivo de poner a prueba esta posibilidad, Amsel y cols. (1977) evaluaron ratas de DP 11 variando el procedimiento en dos aspectos. Por un lado, la hembra anestesiada estuvo presente en todos los ensayos. La diferencia fue que durante la fase de adquisición los animales tenían acceso a una *succión seca* y en la extinción se retenía a las crías en la parte anterior de la caja meta, donde podían percibir el

olor de la hembra sin tener acceso a ella. Por otra parte, se controló la cantidad de tiempo que permanecían en la caja meta durante la extinción: un grupo se retiró inmediatamente al llegar y otro grupo se retiró al cabo de 15 segundos (i.e., emparejando la duración de los ensayos recompensados y no recompensados). Se encontró que ambos grupos adquieren y extinguen la respuesta instrumental de aproximación de forma similar, sugiriendo que el estar expuestos a las claves olfativas de la madre durante los ensayos no recompensados no afecta el desempeño en esta tarea. Tales resultados apoyan y extienden los hallados por Amsel y cols. (1976).

En un estudio más reciente se reportó la existencia de adquisición y extinción de una respuesta operante al DP 5 (Arias, Molina & Spear, 2007). Ambas fases del procedimiento se llevaron a cabo en el mismo día, utilizando como respuesta instrumental una conducta biológicamente relevante para el animal tal como estirarse (i.e., stretching). La fase de adquisición constó de 1 o 2 ensayos de 15 minutos cada uno, seguido de 1 ensayo de extinción de 6 minutos. El entrenamiento consistió en ubicar a una cría sobre una almohadilla térmica en posición semiplana frente a una placa sensible al tacto, de modo que al realizar la conducta de estiramiento y tocar la placa recibiera un pulso de leche por medio de una cánula intraoral (Grupo Experimental). Simultáneamente, un control no apareado recibía la infusión, independientemente de su conducta. El resultado fue un aumento, en el grupo experimental, en la frecuencia de ejecución de conductas motoras producto de la contingencia entre éstas y las infusiones de leche durante la fase de adquisición. A su vez este aumento tuvo un pico en la primera fase de extinción y desapareció hacia el final.

Patrón de Alternancia simple (PA). Es el siguiente efecto “no paradójico” en emerger. Consiste en aprender a responder diferencialmente a una serie sucesiva de ensayos recompensados y no recompensados, emitiendo la respuesta en los primeros e inhibiéndola en los segundos.

De acuerdo con Stanton, Dailey y Amsel (1980) su manifestación se produciría alrededor del DP 11. Se entrenó a dos grupos de ratas (DP 11 y 14 DPN) en un corredor recto, en el cual se encontraba una hembra anestesiada

en la caja meta. Los ensayos pares eran recompensados con acceso a la hembra *con liberación de leche*. En los ensayos impares, no recompensados, los sujetos eran detenidos en un segmento anterior de la caja meta donde se encontraba la hembra, sin acceso a la misma, pero con exposición a su olor. Se halló un aumento en las velocidades de la conducta de aproximación en los ensayos recompensados y una declinación de la respuesta en los ensayos no recompensados en ambos grupos. Los resultados se replicaron en otro experimento con el mismo diseño, con la única excepción que durante los ensayos reforzados se utilizó como reforzador la condición *succión seca*. Por lo tanto, en el DP 11, las ratas serían capaces de discriminar y responder diferencialmente en base a su experiencia en ensayos previos.

Para las consideraciones de la época, el hipocampo jugaría un rol importante en la inhibición o supresión de la respuesta. Sin embargo, al DP 11 las crías muestran PA aun cuando esta estructura se encuentra inmadura. Para arrojar luz sobre este punto, Lobaugh, Bootin y Amsel (1985) realizaron lesiones hipocampales en ratas de DP 10-11 y DP 45-46, bajo las siguientes condiciones: a) lesión y evaluación en la infancia, b) lesión en la infancia, evaluación en la adultez y c) lesión y evaluación en la adultez. A su vez, cada condición contó con su respectivo grupo control (operación simulada - sham - y sin operar). Independientemente de si las lesiones se produjeron en la niñez o adultez, la expresión del PA apareció prácticamente inalterada en todos los grupos. Estos estudios sugieren que el hipocampo no es una estructura necesaria para el aprendizaje de PA.

Efecto de la Magnitud del Refuerzo en la Adquisición (EMRA). Es un efecto no paradójico que consiste en observar tasas de respuestas diferenciales durante la fase de adquisición, en función de la magnitud de la recompensa. Los sujetos expuestos a recompensas altas tienen una tasa de respuesta más alta que los sujetos que reciben recompensas de menor magnitud.

Stanton y Amsel (1980) hallaron EMRA en ratas de DP 11. Los autores llevaron a cabo 3 experimentos donde se evaluó a crías de DP 11, 14 y 16 en un corredor recto. Se utilizaron recompensas grandes y pequeñas, que

consistían en el acceso a una hembra anestesiada *con liberación de leche* y succión *seca*, respectivamente. El diseño experimental constó de 2 fases (precambio y poscambio) y 3 condiciones: sujetos que recibían refuerzos grandes en ambas fases, sujetos sometidos a refuerzos pequeños en las 2 fases y sujetos que recibían un refuerzo grande en el precambio y otro pequeño en el poscambio. A su vez, en otro experimento, se agregó una fase de extinción que se aplicó sólo a los grupos que siempre recibieron refuerzos grandes o pequeños. En todas las edades se halló que los animales que accedieron a una succión *con liberación de leche* corrieron significativamente más rápido que aquellos a los que sólo obtuvieron succión *seca*.

Letz y cols. (1978) y Chen y cols. (1981) reportaron resultados similares variando la forma de proporcionar los reforzadores. Letz y cols. (1978) evaluaron ratas de DP 11 y 14, utilizando como recompensas grande y pequeña, las condiciones de *succión con liberación de leche* y *succión seca*, respectivamente. La diferencia con los trabajos anteriores fue que en ninguna condición se canuló a los animales para la obtención de la leche. En su lugar, indujeron la bajada de leche materna por aplicación de una inyección de oxitocina, previa al entrenamiento. De modo que las crías obtenían la leche directamente al succionar del pezón de la hembra. Por otra parte, el segundo trabajo examinó a ratas de DP 16-17 expuestas a diferentes cantidades de leche (.3, .06 y .02 ml) en un recipiente. Ambos estudios mostraron que, en la fase de adquisición, la velocidad de recorrido de los animales que recibieron recompensas grandes fue mayor que la de aquellos expuestos a refuerzos pequeños. Por otra parte, cabe destacar que en el estudio de Chen y cols. (1981) al utilizar alimento sólido como refuerzo, el EMRA no se manifiesta en las edades mencionadas sino más tempranamente al DP 11. Una posible explicación a este resultado pueda deberse a la familiaridad de las crías con el tipo de reforzador. En ambas edades aún se trata de animales pre-destetados, por lo que su principal fuente de alimento es la leche. Este estímulo podría redundar en una recompensa biológicamente más relevante que el alimento sólido y, por esta razón, resultar más atractivo para las crías.

Efecto de Reforzamiento Parcial en la Extinción (ERPE). Este efecto expresa la persistencia o la perseverancia de una respuesta durante la fase de extinción tras un entrenamiento bajo un programa de reforzamiento parcial (RP), comparado con los sujetos que recibieron un entrenamiento con reforzamiento continuo (RC). Según resultados de Letz y cols. (1978), la ventana de tiempo para la expresión del ERPE se da entre el DP 12 y 14. En dicho trabajo, los autores llevaron adelante una serie de experimentos donde evaluaron ratas entre los DP 11 y 14, variando de un experimento a otro, el uso de ensayos masivos o espaciados, el tipo de succión experimentada (con liberación de leche, succión sin leche y no succión), la cantidad de ensayos empleados para la adquisición y extinción, y el hecho de entrenarlas en el DP 11 y evaluarlas al DP 14. Independientemente de estas variaciones, se observó que al DP 11 hubo una ausencia del ERPE pero que al DP 14 su expresión era evidente. Un aspecto a tener en cuenta en la interpretación de estos resultados es que podrían estar interviniendo efectos de persistencia sensorial intrasesión puesto que los autores refieren como ensayos espaciados a la realización de bloques de ensayos separados por 2 hs. (Weinstock, 1954, 1958).

Por otra parte, se observó que la magnitud del ERPE es mucho mayor (i.e., extinción más lenta) en ratas de DP 21-23 que en edades más avanzadas. Esta diferencia en la expresión del fenómeno parece constituir una característica particular de la edad ya que las diferencias se mantuvieron al equiparar la cantidad de ensayos recompensados durante la fase de adquisición o al variar la magnitud del reforzador (Burdette, Brake, Chen & Amsel, 1976). Asimismo, Brake, Burdette, Chen y Amsel (1980) además de replicar este efecto hallaron diferencias en cuanto a su conservación en ratas de DP 19-21 vs DP 31-33. El diseño constó de 3 fases: adquisición, readquisición y extinción, en el cual se varió el intervalo que transcurría entre los ensayos de adquisición y extinción (i.e., 12 hs., 3 días o 10 días) y la cantidad de ensayos de readquisición previos a la fase de extinción (0, 8 o 24). Se encontró que los animales de DP 19-21 mostraban un ERPE de gran magnitud luego de un intervalo de 12 hs. entre las fases de adquisición y extinción. Este efecto disminuyó cuando transcurrieron 3 días entre las fases y desapareció tras un intervalo de 10 días. No obstante, el ERPE se reestableció

en esta última condición al incluir 8 o 24 ensayos de readquisición previos a la extinción.

En cuanto a las ratas de DP 31-33, se observó que la cantidad de ensayos de readquisición previos a la extinción afecta la expresión del ERPE en forma de U invertida. Es decir, cuando transcurren 10 días entre la fase de adquisición y extinción el efecto desaparece (i.e., 0 ensayos de readquisición). Al proporcionarles 8 ensayos se expresa y desaparece nuevamente al aumentar la cantidad de ensayos de readquisición a 24. En base a ello, se concluyó que en la adolescencia se presentarían algunos factores que interfieren con los procesos de conservación del ERPE.

Dailey, Linder y Amsel, (1983) llevaron a cabo un estudio con cobayos de DP 4-5 con el objetivo de evaluar si en esta especie el ERPE se expresa a una edad menor a la que aparece en la rata (DP 12-14) ya que su sistema septo-hipocampal está relativamente maduro desde el nacimiento. Los animales se entrenaron bajo programas de RC y RP en un corredor recto. Los resultados encontrados concordaron con aquellos esperados, dado que hubo una clara expresión del ERPE en los conejillos de DP 4-5. Tal resultado apoya la hipótesis de dependencia entre el ERPE y el sistema septo-hipocampal. Consistentemente con esto, en ratas, las lesiones en el hipocampo (al DP 10-11 o DP 45-46) anulan la expresión del ERPE, pero no del PA (Lobaugh et al., 1985).

Contraste Negativo simultáneo (CNsim). Este fenómeno involucra intermitencia y contraste. El procedimiento se realiza, usualmente, en dos corredores rectos que difieren en sus claves contextuales. El grupo experimental es expuesto a una recompensa de mayor magnitud en un contexto determinado (e.g., un corredor blanco), y a otra de menor magnitud en otro contexto (e.g., corredor negro). El desempeño se compara con un grupo control que es expuesto a recompensas pequeñas en ambos contextos. La variable dependiente es la velocidad de recorrido y se espera que el grupo experimental responda más lento que el control en el contexto asociado a la recompensa pequeña (Amsel, 1992).

Stanton, Lobaugh y Amsel, (1984) mostraron la existencia de CNsim en ratas de 14 y 17 días, pero no en crías de 11 días. Los sujetos del grupo experimental debían correr por una recompensa grande (succión *con liberación de leche*) ante un olor y por una recompensa pequeña (*succión seca*) ante un olor diferente. A su vez había dos grupos controles, uno de ellos debía correr ante ambos olores por recompensas grandes, y el otro ante ambos olores correr por recompensas pequeñas. Además de la velocidad de recorrido, se utilizó como medida dependiente la latencia de la cría para prenderse al pezón de la hembra anestesiada en la caja meta. Se hallaron diferencias significativas sólo con la medida de latencia. Los análisis de esta medida evidenciaron que en todas las edades las crías fueron capaces de discriminar entre recompensas grandes y pequeñas, es decir tardaron menos tiempo en prenderse al pezón en presencia del olor que predecía la succión con liberación de leche y más cuando el olor anticipaba la succión seca. Sin embargo, sólo las ratas de DP 14 y 17 expresaron CNsim.

Efecto de Magnitud Variable del Refuerzo (EMVRE) y Retraso Parcial del Refuerzo (RPRE) sobre la Extinción. Ambos efectos se caracterizan por la persistencia durante la extinción de la respuesta aprendida. La diferencia entre los dos radica en el programa de reforzamiento durante la fase de adquisición. Mientras que en el EMVRE los animales reciben ensayos reforzados en forma aleatoria con reforzadores grandes y pequeños, en el RPRE reciben la recompensa de manera inmediata o con retraso, también aleatoriamente. En el primer caso la respuesta se compara con grupos que recibieron siempre reforzadores grandes o pequeños, y en el segundo, con animales que recibieron siempre recompensas inmediatas o con retraso. Ambos paradigmas se consideran EPR.

De acuerdo con Chen y cols. (1981), la emergencia de estos efectos se ubicaría entre los DP 16 y 17. En dicha investigación se entrenó a ratas de DP 16-17 bajo programas RC, magnitud variable del refuerzo (.3 ml o .02 ml de leche) y retraso del refuerzo (inmediato o luego de 30 segundos). Tanto el entrenamiento con magnitudes variables como con retrasos del refuerzo redundaron en una respuesta altamente persistente cuando posteriormente se

sometió a los animales a una extinción, en relación a aquellos entrenados con programas RC. Los sujetos sometidos a entrenamientos con magnitudes variables del refuerzo mostraron mayor persistencia en la respuesta durante la fase de extinción, en comparación con aquellos entrenados con RC y con retrasos parciales del refuerzo, durante la extinción.

Efecto del Reforzamiento Parcial en la Adquisición (ERPA). Se trata de un efecto paradójico en el cual los animales muestran una velocidad de recorrido mayor en los primeros dos segmentos del corredor (i.e., partida y corredor) que en el segmento meta cuando se los entrena bajo un programa de RP, en comparación a cuando se lo hace con un programa de RC.

Chen, Gross, Stanton y Amsel (1980) encontraron que este efecto surge entre los DP 18-20. En el estudio se examinó a ratas de DP 18-20 comparadas con animales de DP 50-52, utilizando como recompensa 190 mg de pellet. Para cada rango de edad, se entrenó a un grupo de animales bajo un programa RP y a otro con RC. Se encontró que, independientemente de la edad, los animales ajustados a programas RP corrieron más rápido que los de RC en los segmentos de partida y corredor y más lento en el segmento meta. Asimismo, se halló que las ratas de DP 18-20 aprenden más rápido que los animales de DP 50-52. En otras palabras, los animales más jóvenes alcanzan la asíntota en la velocidad de recorrido antes que las ratas más grandes. Estos resultados indican la presencia de un claro ERPA a los DP 18-20. Un factor importante para la expresión de este fenómeno es que la magnitud de la recompensa sea alta, ya que en estudios previos, evaluando las mismas edades pero con recompensas de menor magnitud, tal efecto no se encontró (Amsel & Chen, 1976, Burdette et al., 1976).

Efecto de Magnitud del Refuerzo en la Extinción (EMRE). Este efecto paradójico se manifiesta por una menor persistencia de la respuesta instrumental o una más rápida extinción cuando la conducta fue reforzada previamente con recompensas de mayor magnitud, en comparación con animales que reciben refuerzos de menor magnitud durante la adquisición.

Chen y cols. (1981) evaluaron este efecto en crías de DP 16-17, a las cuales se les proporcionó 3 magnitudes de recompensa bajo un programa de

RP durante la fase de adquisición: .3 ml de leche (grande), .06 ml (media) o .02ml (pequeña). Los resultados indicaron ausencia de EMRE ya que si bien la velocidad de recorrido difiere en función de la magnitud de la recompensa en la fase de adquisición (i.e., EMRA), no se hallaron diferencias significativas en la tasa de extinción.

No obstante, Burdette y cols. (1976) encontraron EMRE entre los DP 17-23 utilizando alimento sólido como reforzador. Durante la adquisición se presentó 40 mg ó 300 mg de pellets a ratas de DP 17-23 y DP 32-42, bajo un programa de RC. Los resultados indican que en ambas edades los animales de los grupos que recibieron recompensas grandes evidenciaron una mayor tasa de extinción que los sujetos de los grupos que recibieron recompensas pequeñas, aunque las crías de DP 17-23 extinguieron a una tasa más lenta que las de DP 32-42. Estos estudios sugieren que el EMRE se expresa entre los DP 17-23 al utilizar un reforzador sólido, pero no se observa al DP 16-17 utilizando leche como reforzador, lo cual podría estar relacionado a una covariación entre edad y tipo de reforzador (Chen et al., 1981). Tales resultados advierten sobre la importancia del tipo de reforzador o metodología a utilizar para que se exprese un fenómeno determinado.

Contraste Negativo Sucesivo Instrumental (CNSi). En las preparaciones instrumentales a los animales les es requerida una respuesta para acceder a un reforzador, por ejemplo atravesar un corredor recto. Este efecto paradójico del reforzamiento se expresa por una disminución abrupta de la velocidad de recorrido tras experimentar el cambio sorpresivo de un reforzador de mayor magnitud/calidad por otro de menor magnitud/calidad en la caja meta de un corredor recto. La característica principal es que tal disminución se produce por debajo de los niveles alcanzados en un grupo control que siempre recibió un reforzador de menor magnitud (Amsel, 1992; Crespi, 1942).

Se llevaron a cabo 2 trabajos con el objetivo de determinar la edad de emergencia de este efecto. En el primero de ellos, Stanton y Amsel (1980), reportaron resultados negativos en cuanto a la aparición del CNSi en las edades evaluadas (DP 11-14). Se establecieron como valores de precambio

(grande) y poscambio (pequeño) de la recompensa, la succión de los pezones de una hembra anestesiada *con liberación de leche y succión seca*, respectivamente. En el segundo de los trabajos (Chen et al., 1981), se evaluó ratas de DP 17-24 a DP 61-68 de edad. Cuando se utilizó reforzadores sólidos (i.e., 300 mg vs 20 mg de pellets) el CNSi se observó al DP 34-35. Sin embargo, al utilizar leche en un recipiente (.3 ml vs .02 ml) como reforzador, el CNSi se expresó al DP 25-26. Nuevamente, esto evidencia que el tipo de reforzador constituiría un factor determinante en la expresión del CNSi.

Respuesta Demorada (RD). En este procedimiento el animal recibe el refuerzo si presenta su respuesta demorada durante un periodo de tiempo estipulado por el experimentador. Este procedimiento implica que para recibir la recompensa el animal debe inhibir el impulso de correr más velozmente, característico de los procesos de adquisición. Chen, Gross, Stanton y Amsel (1981) estudiaron RD en ratas de DP 18-21 y DP 60-63, bajo tres condiciones experimentales: RC, RD donde se recompensaba los ensayos en los que a los sujetos les tomaba más de 5 segundos atravesar los primeros 122 cm del corredor lineal; y una tercera condición apareado con el grupo RD y, por lo tanto, reforzado al mismo tiempo que lo era RD. El reforzador que se colocó en la caja meta fue 97 mg de alimento sólido. Se encontró que las ratas de DP 60-63 obtuvieron más recompensas que las de DP 18-21 debido a que con el correr de los ensayos las primeras lograron ajustarse al tipo de respuesta requerida, mientras las ratas de DP 18-21 no fueron tan eficaces en demorar la respuesta para obtener el reforzador. Los autores sugieren que a los DP 18-21 las ratas no tendrían la capacidad de regular sus respuestas bajo condiciones de reforzamiento sujeto a RD.

De acuerdo con los trabajos presentados, los efectos que involucran refuerzo intermitente (e.g., PA y ERPE) aparecerían más temprano que los que presentan refuerzo continuo (e.g., CNSi y EMRE) sugiriendo la disociación de los mecanismos responsables de su expresión. Por otra parte, el hecho de que efectos como PA, ERPE y EMRA aparezcan a edades más tempranas que el CNS o RD descarta la posibilidad de una ausencia de procesos de memoria o discriminación en ratas infantiles. Según Amsel, el orden de aparición de estos

efectos expresa la creciente capacidad del animal para inhibir su conducta (Gray, 1987). Esta capacidad está relacionada con la maduración del hipocampo. De acuerdo con esta conceptualización, aquellos efectos que requieren de una inhibición de la respuesta más intensa, como es el caso del CNS y RD, serán los últimos en aparecer en la ontogenia de la rata. En contraposición, aquellos que necesitan una supresión de menor intensidad se manifestarán con anterioridad. Los resultados de los trabajos arriba presentados apoyan esta interpretación.

La Tabla 5 resume los estudios expuestos en este capítulo sobre los fenómenos del aprendizaje y su manifestación en los diferentes momentos de la ontogenia de la rata.

FENÓMENO	DP	MÉTODO	MEDIDA DEPENDIENTE	REFORZADOR	CITA
Aversión al sabor	5	Infusión intraoral por cánula	Consumo de la solución	Sacarina	Gemberling, Domjan y Amsel, 1980 Gregg, Kittrell, Domjan y Amsel, 1978
Adquisición y Extinción instrumental	5	Infusión intraoral por cánula	Cantidad de contactos en una placa	Leche	Arias, Molina, Spear y Molina, 2007
Adquisición y Extinción instrumental	10	Corredor recto	Velocidad de recorrido	Succión seca de madre anestesiada	Amsel, Brudette y Letz, 1976
Patrón de alternancia simple (PA)	11	Corredor recto	Velocidad de recorrido	Succión con leche y seca de madre anestesiada	Stanton, Dailey y Amsel, 1980
Efecto de la Magnitud del Reforzamiento sobre la Adquisición instrumental (EMRA)	11	Corredor recto	Velocidad de recorrido	Succión con leche y seca de madre anestesiada	Stanton y Amsel, 1980
Efecto del Reforzamiento Parcial sobre la Extinción (ERPE)	12 a 14	Corredor recto	Velocidad de recorrido	Succión con leche y seca de madre anestesiada	Letz, Brudette, Gregg, Kittrell y Amsel, 1978 Chen y Amsel, 1980ab
Contraste Negativo simultáneo (CNsim)	14 a 17	Corredor recto	Latencia de agarre al pezón	Succión con leche y seca de madre anestesiada	Stanton, Lobaugh y Amsel, 1984
Efecto de Magnitud Variable del Reforzamiento sobre la Extinción (EMVRE)	16 a 18	Corredor recto	Velocidad de recorrido	Leche en un recipiente	Chen, Gross, y Amsel, 1981
Retraso Parcial del Refuerzo (PDREE)	16 a 18	Corredor recto	Velocidad de recorrido	Leche en un recipiente	Chen, Gross, y Amsel, 1981
Efecto del Reforzamiento Parcial sobre la Adquisición	18 a 20	Corredor recto	Velocidad de recorrido	Alimento sólido	Chen, Gross, Stanton y Amsel, 1980

(ERPA)					
Efecto de Magnitud del Reforzamiento sobre la Extinción (EMRE) - RC	18 a 23	Corredor recto	Velocidad de recorrido	Alimento sólido	Brudette, Brake, Chen y Amsel, 1976
Efecto de Magnitud del Reforzamiento sobre la Extinción (EMRE) - RP	20 a 21	Corredor recto	Velocidad de recorrido	Leche en un recipiente	Chen, Gross, y Amsel, 1981
Contraste Negativo Sucesivo instrumental (SNCi)	25 a 26	Corredor recto	Velocidad de recorrido	Leche en un recipiente	Stanton y Amsel, 1980 Chen, Gross, y Amsel, 1981
Regulación de las Respuestas en el programa de Demora en la respuesta (RD)	63	Corredor recto	Velocidad de recorrido	Alimento sólido	Chen, Gross, Stanton y Amsel, 1981

Tabla 5. Estudios ontogenéticos de los fenómenos paradójicos y no paradójicos del aprendizaje en ratas. Se incluye en la tabla los estudios que revelan la edad de aparición de los fenómenos.

Conclusiones

Una síntesis del análisis de los estudios ontogenéticos del aprendizaje en ratas infantiles indica que el orden de aparición de los fenómenos de aprendizaje ocurre desde los no paradójicos hacia los EPR. De acuerdo con Amsel (1992), estos hechos sugieren que existe un incremento de la complejidad de los procesos asociativos relacionados con el desarrollo cerebral, al menos en los mamíferos. En este sentido, habría dos niveles de funcionamiento. Uno más “primitivo” y por lo tanto el primero en aparecer durante el desarrollo, llamado *disposicional* o *pre-cognitivo*. Se caracteriza por el aprendizaje que emerge gracias a la acción directa del refuerzo, sin que esté mediatizado por expectativas. A este nivel se encontrarían los aprendizajes no paradójicos y procedurales, como el condicionamiento clásico, en el cual estaría implicada la memoria implícita o procedural. Este tipo de funcionamiento, hablando en términos filogenéticos y ontogénicos, operaría en todas las especies animales. Los estudios realizados más recientemente en ratas neonatas e infantiles en los que se evaluaron procesos de aprendizajes más complejos, aunque relacionados con el condicionamiento clásico siguen apoyando esta hipótesis. Por ejemplo, se halló aprendizaje de aversión condicionada al sabor y preferencia de lugar condicionada, ambos mediados por etanol, en ratas de DP 10 (para una revisión ver Pautassi, Nizhnikov & Spear, 2009).

El segundo nivel, denominado *representacional*, aparecería en edades más tardías del desarrollo, y reviste mayor complejidad porque involucra expectativas y memorias más complejas que la procedural. En este nivel tiene lugar un “aprendizaje sobre las recompensas”, es decir, tras experimentar que bajo las mismas condiciones contextuales aparece un reforzador, un sujeto tiene la capacidad de anticipar con precisión el tipo y clase de reforzador que recibirá, lo cual equivale a decir que generará una expectativa sobre las propiedades de la recompensa. Es aquí donde se ubicaría a los EPR del aprendizaje.

Esta teorización destaca el rol de la inhibición conductual sobre los EPR puesto que para su expresión además de poder generar una expectativa sobre

las recompensas se debe, por ejemplo, desarrollar la capacidad de detectar “errores/discrepancias” y actuar en consecuencia. La principal estructura neural que se postuló para cumplir esta función es el sistema hipocampal (Gray, 1987). Los resultados de los estudios llevados a cabo por Amsel muestran que los EPR que aparecen en último término, como el CNSi o el RD, se caracterizan por una supresión más intensa de la respuesta en comparación con los efectos que aparecen con anterioridad. El supuesto teórico es que, a medida que el hipocampo se desarrolla, la habilidad para realizar supresión en la conducta sería cada vez más intensa, dando lugar a la manifestación secuencial de los EPR. Una de las funciones del hipocampo sería la de comparar los eventos actuales del ambiente con los eventos esperados. Cuando una recompensa es menor a la esperada, los circuitos en el hipocampo podrían inhibir el comportamiento que conduce a aquel evento. Este comparador de recompensas envía un impulso al sistema ataque-huída (sistema que detecta los estímulos aversivos incondicionados). Por lo tanto, la devaluación de un reforzador esperado activaría el mismo mecanismo que la presentación de estímulos aversivos. Asimismo, los estímulos condicionados asociados a una experiencia de devaluación del refuerzo, a través del condicionamiento clásico, incrementan su capacidad de activar este mecanismo en futuras ocasiones (Gray, 1987; Gray, & McNaughton, 2000).

Sin embargo, la aparición de los efectos estudiados puede depender de las características del reforzador (e.g., sólido o líquido), del procedimiento utilizado (e.g., instrumental o consumatorio) y del tipo de respuesta evaluada (e.g., velocidad de recorrido, ganancia de peso en consumo de soluciones azucaradas, latencia de agarre al pezón de una madre anestesiada), entre otros. Claros ejemplos de esto se vio con el CNSi y el EMRE. En el primer caso, el fenómeno se expresa al DP 25-26 usando leche como reforzador, pero no cuando se utiliza alimento sólido (Chen et al., 1981). Por el contrario, el EMRE se manifiesta al DP 17-23 con el uso de alimento sólido y no así cuando la recompensa es leche.

Por otra parte, algunos EPR en los cuales se miden respuestas consumatorias, muestran que las estructuras cerebrales necesarias para su expresión son diferentes a las de las respuestas instrumentales. Por ejemplo,

lesiones en el hipocampo en la rata adulta no alteran la manifestación del CNS consumatorio (CNSc – Flaherty et al., 1989) aunque eliminan la expresión del CNSi (Salinas & White, 1998). Esto plantea la necesidad de reevaluar la ontogenia de los EPR y no paradójicos del aprendizaje con nuevas metodologías y también técnicas de desarrollo más reciente que permitan profundizar en el conocimiento de las bases fisiológicas y neurobiológicas de los EPR y de la memoria. Teniendo en cuenta estos aspectos, la siguiente etapa experimental de la presente tesis se enfocó en el desarrollo de una metodología consumatoria que contemple las peculiaridades propias de la etapa ontogenética a evaluar (Capítulo V). Una vez que se establecieron parámetros básicos, como cantidad de ensayos y magnitudes de recompensas, se profundizó en la evaluación de algunos EPR (Capítulo VI), incorporando el registro de medidas originales e inéditas en el contexto de los EPR como lo es el Test de Reactividad al Sabor (Capítulo IV).

Capítulo III

Relatividad de los Incentivos: teorías y estudios

La capacidad de poder establecer comparaciones resulta una estrategia útil a la hora de actuar de manera eficiente en nuestro medio, ya que nos permiten reaccionar y elegir entre aquellas opciones que más nos benefician en el presente o en el futuro. La frustración o la euforia son posibles reacciones que pueden surgir de estas comparaciones. La diferencia entre ambas emociones radica en la comparación que se realiza entre el evento actual y pasado. Cuando nos encontramos con situaciones *peores* a las que esperábamos surgen reacciones de frustración. Por el contrario, el experimentar una situación *mejor* a la esperada induce reacciones de euforia. Existen diversos procedimientos experimentales para estudiar estos fenómenos, uno de ellos es a través del estudio de cambios sorprendentes del reforzamiento (Papini & Dudley, 1997). El CNS y Contraste Positivo Sucesivo (CPS) constituyen dos de los procedimientos más utilizados, dentro de este conjunto de fenómenos, para la evaluación de respuestas de frustración y euforia, respectivamente.

Como se describió en el capítulo I, el CNS consiste en observar un desempeño significativamente peor en un grupo que experimentó el cambio de un reforzador de mayor a menor magnitud, en comparación a un grupo que siempre recibió la recompensa de menor magnitud. Si la respuesta que se mide es el consumo de soluciones el fenómeno recibe el nombre de CNSc. En cambio, si al animal se le requiere una respuesta operante para acceder al reforzador (e.g., recorrer un corredor lineal o presionar una palanca) se trata de un CNSi. En ambos casos, la frustración se expresa por una disminución abrupta de la respuesta ante el reforzador devaluado. Esta situación constituye una respuesta emocional aguda y transitoria, luego de la cual los animales aumentan gradualmente su respuesta hacia el nivel esperado para el reforzador devaluado con las sucesivas exposiciones (Amsel, 1958, 1992).

Por su parte, el CPS consiste en proporcionar al grupo experimental un reforzador de mayor magnitud tras haber experimentado en sucesivos ensayos previos una recompensa de menor magnitud. El fenómeno de CPS se observa

como un incremento del desempeño del grupo experimental por encima de un grupo control que siempre recibió el reforzador de mayor magnitud (Crespi, 1942; Cuenya, Mustaca & Kamenetzky, 2015; Cuenya, Serafini, Mustaca & Kamenetzky, 2015; Flaherty, 1996). A diferencia de lo que ocurre con el CNS, son relativamente pocos los estudios que exploran el contraste positivo puesto que se trata de un fenómeno elusivo. Tal es así que algunos autores cuestionan la existencia de este efecto (Annicchiarico, Glueck, Cuenya, Kawasaki, Conrada & Papini, 2016). Por esta razón, la mayoría de los estudios experimentales y las teorías sobre los efectos de contraste se centraron en el CNS.

Un aspecto a destacar es que en ambos casos de contraste existe violación de una expectativa, lo que muestra que los reforzadores presentan no sólo un valor objetivo o absoluto por sus características sensoriales y/o nutricionales, sino también un valor relativo en función de otros reforzadores presentes y de los refuerzos que el animal recibió en ese contexto en el pasado. Esto es lo que se denomina relatividad de los incentivos (Flaherty, 1996)

En este capítulo se realizará un recorrido por las principales teorías sobre los efectos de frustración y los trabajos empíricos que dan cuenta de los diferentes componentes implicados. Asimismo, se describirán algunos estudios que marcan las diferencias entre el contraste instrumental y consumatorio y su evaluación durante etapas tempranas de la ontogenia. Finalmente se dedicará un apartado a la descripción de trabajos empíricos explorando el CPS.

Principales teorías sobre la frustración

Existen diversas teorías acerca de los mecanismos que subyacen a la frustración. La diferencia entre ellas radica principalmente en el peso relativo que otorgan a los componentes cognitivos y emocionales. A la actualidad, las teorías que enfatizan los aspectos emocionales son las que cuentan con mayor sustento empírico.

Una de ellas es la propuesta por Amsel (1958, 1992) quien explica los fenómenos de relatividad de los incentivos como un producto de mecanismos de aprendizaje y asociación de estímulos. Define a la frustración como un

cambio en el estado del organismo que se desencadena cuando un sujeto experimenta una devaluación sorpresiva en la calidad o cantidad de un reforzador apetitivo, en presencia de señales previamente asociadas a un reforzador de mayor magnitud. Su teoría postula que los animales aprenden a anticipar la recompensa cuando se encuentran frente a estímulos que estuvieron asociados con anterioridad al reforzador. En el momento que el animal encuentra un reforzador menor al esperado se produce una reacción incondicionada llamada *frustración primaria* como consecuencia de la discrepancia entre el refuerzo esperado y el obtenido. Tal reacción es análoga a la que provocan estímulos aversivos como las descargas eléctricas. Algunas de las reacciones que se reportaron son aumento en la actividad general, en la ansiedad y en la variabilidad de la respuesta, agresión en procedimientos instrumentales y disminución de la dominancia en procedimientos consumatorios, escape, aumento de corticosterona en el plasma sanguíneo, emisión de un olor característico en ratas y de ultrasonidos especialmente en ratas infantas, llantos en bebés y alteraciones inmunológicas y sexuales en ratas macho (ver Mustaca et al., 2009; Papini & Dudley., 1997). Mediante procesos de condicionamiento, los estímulos presentes se asocian a esta reacción aversiva de frustración. Las posteriores presentaciones de estos estímulos provocan una reacción de *frustración condicionada* que ocasiona respuestas de alejamiento y evitación del reforzador devaluado (Amsel, 1958; 1962). Esto explicaría la disminución abrupta del consumo (en el CNSc) o de la respuesta instrumental (en el CNSi).

Un importante cuerpo de estudios empíricos avala la existencia de este componente emocional y aversivo en situaciones de devaluación del incentivo. Trabajos en los que se administraron drogas con perfil ansiolítico atenúan la expresión del CNSc. Por ejemplo, la administración de ansiolíticos como el chlordiacepóxido (Rosen & Tessel, 1970), flurazepan (Flaherty, 1990), midazolam (Becker, 1986; Flaherty, 1990) y diazepam (Liao & Chuang, 2003) producen una recuperación más rápida del efecto de frustración. Resultados similares se obtuvieron con la utilización de etanol (Becker & Flaherty, 1982), morfina (Rowan & Flaherty, 1987) o agonistas de los receptores opioides (Wood, Daniel & Papini, 2005). Complementariamente, la aplicación de

naloxona, un antagonista opioide, revierte el efecto atenuante de los opioides sobre el CNSc (Daniel, Ortega & Papini, 2009; Pellegrini, Wood, Daniel & Papini, 2005; Rowan & Flaherty, 1987).

Un punto a destacar acerca del efecto de estas drogas sobre el CNSc, es que en la mayoría de los estudios se encontró que la atenuación de este fenómeno se produjo cuando se aplicaron antes del segundo ensayo de devaluación, pero no antes del primero. En este contexto, el modelo de las múltiples etapas del CNSc de Flaherty (1996) surge como un intento de explicar tales resultados. Si bien el énfasis se encuentra en los factores emocionales, su teoría intenta incorporar factores cognitivos como el proceso de comparación y búsqueda del reforzador previo. Postula que durante la etapa de poscambio acontecen dos fases en forma consecutiva. En la primera predominan procesos perceptuales y cognitivos que se disparan ante el primer contacto con la solución devaluada. Cuando el animal toma contacto con dicho reforzador, realizaría una evaluación cognitiva (comparación de la actual recompensa con la anterior) y la consecuente búsqueda del reforzador perdido. En la siguiente etapa, se desencadenarían respuestas de estrés como consecuencia de los intentos fallidos de hallar un reforzador mejor que el obtenido en el poscambio. Esta fase involucra un conflicto entre la decisión de aproximarse a la solución devaluada por su valor absoluto de refuerzo, y la decisión de retirarse y continuar la búsqueda, en función del valor relativo del reforzador devaluado en comparación con la memoria del reforzador preferido.

Una explicación neurobiológica para dar cuenta de estos fenómenos se propuso por Gray (1987) y luego se reformuló por Gray y McNaughton (2000). La misma propone tres sistemas conductuales: (1) un sistema de acercamiento conductual, que controla la aproximación a los estímulos apetitivos incondicionados y condicionados que señalan el refuerzo o la ausencia de castigo, (2) sistema de ataque-huída-congelamiento, que detecta los estímulos aversivos incondicionados y condicionados, (3) sistema de inhibición conductual, el cual controla la resolución de situaciones de conflicto. La interconexión entre estos sistemas supone la existencia de un *comparador de recompensas* que, en presencia de señales específicas del ambiente, recibiría de la memoria almacenada información sobre la calidad y cantidad de la

recompensa esperada. Esta información luego se compararía con la recompensa efectivamente obtenida. Si esta última es menor a la esperada, el comparador de recompensa envía un impulso al sistema ataque-huida-congelamiento (encargado de detectar los estímulos aversivos incondicionados y condicionados). De este modo, la devaluación de un reforzador esperado activaría el mismo mecanismo que la presentación de estímulos aversivos. Los estímulos percibidos antes de esa recompensa frustrante, a través del condicionamiento clásico, incrementan su capacidad de activar este mecanismo en futuras ocasiones. Así, los estímulos condicionados de frustración pueden conducir a la inhibición de la respuesta. Los sustratos cerebrales que se proponen como fundamentales en la función de comparación de recompensas son el septum y el hipocampo. Una de las funciones del hipocampo sería la de comparar los eventos actuales del medio ambiente con los eventos esperados. Gray sugiere que cuando una recompensa es menor a la esperada, los circuitos en el hipocampo podrían inhibir el comportamiento que conduce a aquel evento.

Estudios donde se lesionaron estas estructuras apoyan la propuesta de Gray, puesto que reportan la eliminación de la expresión del CNSi (Flaherty et al., 1998; Salinas & White, 1998). No obstante, la teoría neurobiológica posee sustento empírico solo en el caso del CNSi ya que lesiones en esas áreas no alteran la expresión del CNSc (Flaherty et al., 1998; Flaherty et al., 1979).

Por otro lado, existen resultados experimentales que reflejan que la no-recompensa actúa como un estresor. Por ejemplo, se halló un incremento significativo de los niveles de corticosterona (hormona relacionada a situaciones de estrés) en sangre ante la omisión de un reforzador (Kawasaki & Iwasaki, 1997) como ante su devaluación (Flaherty, Becker & Pohorecky, 1985; Mitchell & Flaherty, 1998; Pecoraro, Jong & Dallman, 2009), incremento de las conductas de ambulación y elevación en patas traseras (Flaherty, Blitzer & Collier, 1978; Pellegrini & Mustaca, 2000), alteraciones en el comportamiento sexual (Freidin & Mustaca, 2004) así como disminución del efecto de frustración en ratas que eyaculaban previamente a la omisión del reforzador (Freidin, Kamenetzky & Mustaca, 2005), despliegue de conductas de sometimiento (Mustaca & Martínez, 2000), alteraciones en el sistema inmune

(Mustaca, 1999) y disminución en la percepción del dolor (Mustaca & Papini, 2005). También se mostró que los animales escapan de claves asociadas con la ausencia o devaluación de un reforzador esperado (Daly, 1974) y que la administración de corticosterona inmediatamente después del primer ensayo de poscambio en un CNSc acentúa el efecto de contraste (Bentosela, Ruetti, Muzio, Mustaca & Papini, 2006). Mediciones a nivel de marcadores biológicos de actividad neuronal, como el c-fos, indican una clara y robusta expresión en zonas corticales y subcorticales luego del primer ensayo de devaluación de una solución (Pecoraro & Dallman, 2005).

Si bien estos antecedentes equiparan las respuestas de frustración y castigo, un estudio reciente muestra que ambas experiencias no serían exactamente idénticas a nivel neurofisiológico, puesto que gatillan la activación de neuronas diferenciales en el núcleo central de la amígdala (Purgert, Wheeler, McDannald & Holland, 2012).

En conjunto, estos trabajos apoyan fuertemente la teoría de Amsel puesto que ponen en evidencia el componente emocional en la reacción inicial ante la devaluación del incentivo y equiparan la respuesta de frustración a la presentación de estímulos aversivos.

Contraste Negativo Sucesivo instrumental y consumatorio

Al inicio de este capítulo se indicó que la diferencia entre el CNSi y el CNSc consiste en que el primer caso el sujeto debe realizar una respuesta operante para acceder al reforzador, mientras que en el protocolo consumatorio la recompensa se encuentra a libre disposición. No obstante, esta no constituye la única diferencia entre los fenómenos. Lesiones en ratas adultas sugieren que ambos procesos son independientes y que estarían sustentados por estructuras cerebrales diferentes. Flaherty y cols. (1998) compararon los efectos de lesiones hipocampales bilaterales sobre el CNSi y CNSc sometiendo a los mismos animales a ambos procedimientos. Las lesiones solo afectaron la expresión de CNSi, dado que las ratas intervenidas se comportaron como las controles al recibir la devaluación, en tanto que el CNSc no se vió afectado en ninguno de los grupos devaluados. Resultados similares reportan Salina y White (1998) en relación a la expresión del CNSi y lesiones del hipocampo. En

el mismo sentido, lesiones en la corteza entorrinal eliminaron el CNSi pero no afectaron el CNSc (Flaherty et al., 1995).

Flaherty sugiere que en el CNSc el sistema septo-hipocampal juega un rol mínimo, mientras que la amígdala asume un papel preponderante. Esta observación se apoya en estudios en los cuales lesiones electrolíticas de la región central de la amígdala bloquean completamente la aparición del CNSc y en el área basolateral lo reducen (Becker et al., 1984; Capobianco & Hamilton, 1973; Flaherty & Hamilton, 1971; Flaherty et. al., 1989). Complementariamente, se halló que la administración intra-amígdala de diacepam reduce el CNSc en forma dosis-dependiente, mientras que las infusiones intra-hipocampales no producen modificaciones (Liao & Chuang, 2003). Por otra parte, lesiones del septum no afectaron el contraste consumatorio (Flaherty et al., 1979).

A nivel de desarrollo neuronal, también se encontrarían diferencias en cuanto al momento ontogenético que las áreas principalmente implicadas en ambos fenómenos alcanzan su punto máximo de desarrollo. Por ejemplo, las células granulares del giro dentado (i.e., sistema septo-hipocampal) comienzan el proceso de diferenciación con mayor rapidez entre los DP 12-14, alcanzando los niveles que se presentan en la adultez alrededor de los DP 25-30 (Amsel & Stanton, 1980). En cambio, el complejo amigdalino alcanzaría el punto máximo de desarrollo neuronal alrededor del DP 14. Luego de esta edad no se observan modificaciones sustanciales (Berdel et al., 1997).

Otras áreas cerebrales que serían relevantes para la manifestación del CNSc son el núcleo pontino parabraquial y el tálamo gustativo. Se reportó que la lesión de ambas estructuras en ratas adultas elimina el CNSc (Grigson, Spector & Norgen, 1994; Reilly & Trifunovic, 2003).

Una estrategia alternativa y menos invasiva que las anteriores para inferir las áreas implicadas en fenómenos del aprendizaje consiste en la evaluación de estos efectos en diferentes momentos del desarrollo. Sin embargo, son escasos los estudios realizados en bebés humanos y ratas infantiles en los que se evaluó el CNS. Las evidencias con humanos muestran que habría una regulación emocional de las respuestas a edades tempranas. Mast, Fagen, Rovee-Collier y Sullivan (1980) llevaron a cabo un experimento

con bebés humanos de 82 a 112 días buscando evaluar la existencia de CNSi. Los bebés debían dar patadas a un móvil colgante con 10, 6 ó 2 sonajeros en la fase de precambio. En la fase de poscambio a todos se les presentó un colgante con solo 2 elementos. Además de la respuesta instrumental de dar patas, se midió la atención visual hacia el colgante y las vocalizaciones negativas que emitían. Se encontró que los bebés expuestos previamente a un móvil con 10 o 6 sonajeros realizaron menor cantidad de patadas que aquellos expuestos a 2 sonajeros en ambas fases. En relación a las otras medidas, se halló que, en comparación con los controles, la atención visual disminuyó y las vocalizaciones negativas aumentaron cuando se los expuso a un móvil con menos sonajeros. Por otra parte, Kobre y Lipsitt (1972) hallaron un efecto de contraste negativo sobre la respuesta consumatoria de chupeteo en bebés de 4 y 10 hs. de vida. Los autores midieron la tasa de succiones sobre un pezón artificial, en un grupo de bebés que pasaron de 15% de sacarosa a agua o ningún fluido, comparados con un grupo que recibió agua o ningún fluido. Ante el cambio de sacarosa a agua o nada, los bebés chupetearon significativamente menos que aquellos que siempre obtuvieron agua o ningún estímulo líquido. Los autores sugieren que este cambio en la tasa de succiones responde a proceso de aprendizaje sobre las recompensas.

En relación a los estudios con ratas infantiles, Chen et al. (1981) reportan que crías de DP 25-26 disminuyen significativamente la velocidad de recorrido en un corredor luego de experimentar una devaluación en la cantidad de leche en la caja meta (i.e., .3 ml a .02 ml). Este efecto no se halló en ese rango edad al utilizar alimento sólido como reforzadores, ni a una edad más temprana (i.e., DP 11-14) al usar reforzadores biológicamente relevantes como la aproximación y latencia de agarre a los pezones de una hembra anestesiada (Stanton y Amsel, 1980). Estos resultados sustentan la explicación neurobiológica que postula al sistema septo-hipocampal como la principal estructura responsable de controlar los mecanismos de inhibición ante situaciones de devaluación del incentivo (Gray, 1987; Gray & McNaughton, 2000) puesto que al DP25-26 el desarrollo neuronal de esta estructura alcanza niveles de maduración similares a la de los adultos (Amsel & Stanton, 1980).

Hasta el momento de la redacción de la presente tesis, no se encontraron trabajos que evalúen efectos de contraste en ratas infantiles usando procedimientos consumatorios. Sobre la base de los antecedentes previamente expuestos, es probable que el CNSc se exprese a una edad más temprana que lo encontrado con procedimientos instrumentales dado que las áreas involucradas en ambos fenómenos maduran en momentos diferentes del desarrollo de la rata (Berdel et al., 1997; Amsel & Stanton, 1980).

Contraste Positivo Sucesivo: estudios empíricos

Uno de los primeros trabajos que reportaron este efecto se llevó a cabo por Crespi (1942). Entrenando ratas adultas en el recorrido de un corredor recto para obtener una recompensa, mostró que al incrementar la cantidad de alimento sólido (i.e., 4 a 16 pellet de comida) los animales que experimentaron el cambio recorrieron el laberinto significativamente más rápido, en comparación con los animales que siempre habían recibido la mayor cantidad de recompensa (i.e., 16 unidades).

Diversos trabajos fallaron en replicar el fenómeno, probablemente debido a un efecto de techo. Es decir, el grupo control (que en ambas fases recibe la recompensa de mayor magnitud) alcanza niveles altos de respuesta, lo cual dificulta la posibilidad de detectar el efecto. Por esta razón algunos autores propusieron variar algunos parámetros del protocolo típico para propiciar su manifestación. Por ejemplo, Mellgren (1971) encontró CPSi al proporcionar el cambio de recompensa antes que los animales lleguen a la asíntota de la respuesta instrumental durante la fase de precambio. Asimismo, experimentar múltiples disminuciones del reforzador previo al cambio hacia una recompensa grande (Maxwell, Calef, Murray, Shepard, & Norville, 1976), así como también variar la duración de la recompensa (Weatherly, Melville, & Swindell, 1997) induciría un efecto de contraste positivo. Por otra parte, experimentar situaciones de estrés durante el desarrollo, como el aislamiento social, puede incidir sobre la expresión del CPSc en la adultez (Cuenya et al., 2015). Este tipo de inconvenientes ha motivado discusiones incluso sobre la existencia del fenómeno, aún luego del trabajo de Crespi (1942). El consenso

actual en la literatura propone que el contraste positivo es un fenómeno elusivo pero constatable bajo ciertos parámetros experimentales (ver Flaherty, 1982).

Una alternativa original para evitar los problemas metodológicos que conlleva la evaluación del CPS con recompensas apetitivas, es la utilización de protocolos aversivos. Cándido, Maldonado, Rodríguez y Morales (2002) hallaron CPSi en una situación aversiva que involucraba el uso de estímulos nociceptivos. Las ratas se ubicaban en un compartimento en el que recibían una señal de alarma seguida de una descarga eléctrica. Los animales aprendían a anticipar la descarga y a evitarla escapando hacia un compartimento seguro (i.e., ausente de descargas). Durante la fase de precambio, al grupo experimental se le permitió permanecer allí solo 1 segundo, mientras que en la fase de poscambio este tiempo se extendió a 30 segundos. El grupo control podía permanecer 30 segundos en el compartimento seguro, en ambas fases. Se halló que durante la fase de poscambio el grupo experimental realizó conductas de escape en un tiempo significativamente menor en comparación con el grupo control. Los autores proponen que el lugar seguro adquiere propiedades reforzantes gracias a la relación entre lo que se experimentó en las fases de pre y poscambio. Por otra parte, algunos estudios sugieren que los procesos emocionales también juegan un papel importante en este efecto. Maldonado, Cándido, Morales y Torres (2006) reportaron que la administración de diazepam previo al cambio de reforzador (i.e. pasar de 1 a 30 segundos en el compartimento seguro) atenúa el CPSi. Asimismo, cuando se evaluó a cepas de ratas seleccionadas genéticamente, basadas en su desempeño en una tarea emocional, se halló que los sujetos altamente emocionales mostraron CPSi en comparación a la cepa menos emocional, quienes no expresaron el fenómeno (Maldonado et. al., 2007).

Nuevamente, estos antecedentes dan cuenta de la evaluación del fenómeno con un procedimiento instrumental, donde existe una señal que anticipa la aplicación de un estímulo aversivo nociceptivo. Sin embargo, su estudio con la utilización de un paradigma consumatorio y sabores aversivos es inexistente. En este punto, resulta inevitable plantearse la pregunta: ¿Será posible encontrar CPSc proporcionando diferentes concentraciones de una

solución innatamente aversiva? En otras palabras, ¿Nuestras experiencias negativas previas impactarán positivamente sobre la evaluación actual de situaciones moderadamente negativas? En el capítulo V de esta tesis se abordará este tema con la propuesta de un diseño experimental novedoso y original en lo que respecta al estudio del CPSc.

Una síntesis de los trabajos expuestos indica que el fenómeno del CNS cuanta con amplia evidencia, tanto es sus preparaciones instrumentales como consumatorias, en detrimento de lo que sucede con el CPS. Esto ha redundado en la propuesta de teorías enfocadas en la explicación del fenómeno de contraste negativo, las cuales destacan en mayor o menor medida el papel que juegan los procesos emocionales en la expresión de este efecto.

Capítulo IV

Respuestas de Reacción al Sabor

Hasta la década del '90 las investigaciones donde se evaluaba la conducta consumatoria de un reforzador, consideraban los conceptos de *saliencia del incentivo* (i.e., wanting en inglés) e *impacto hedónico* (i.e., liking en inglés) como indistinguibles e incluso sinónimos. Esto suponía asumir que si una recompensa se quiere consumir es porque necesariamente gusta. E inversamente, si no se quiere consumir es porque produce disgusto. Varios trabajos recientes señalan que, si bien en ocasiones pueden ir en la misma dirección, ambos fenómenos son dissociables e independientes, con bases neurobiológicas distinguibles (Berridge, 1996; Berridge, Robinson & Aldridge, 2009, Castro & Berridge, 2014; Jiang, Soussignan, Schaal & Royet, 2015; Nagy, Takács, Szabó, Lénárd & Karádi, 2012; Smith & Berridge, 2005).

La *saliencia del incentivo* hace referencia a la motivación para acercarse y consumir un reforzador. Este término engloba conductas preparatorias y de aproximación hacia una recompensa, así como el consumo voluntario de la misma. Estos comportamientos son los que habitualmente se miden para evaluar, por ejemplo, la preferencia por una solución en un test de doble botella. No obstante, varios estudios mostraron que el evitar el consumo de una solución (i.e., acercarse y no consumir) no necesariamente implica el disgusto por la misma (Limbeer & Parker, 2000; Parker, 1995; Parker & MacLeod, 1991), ni que el consumo exacerbado suponga mayor agrado hacia una sustancia (Berridge et al. 2009). Por ejemplo, Tindell, Berridge, Zhang, Peciña y Aldridge (2005) informaron que la administración de anfetamina aumenta las respuestas de acercamiento y búsqueda hacia un estímulo que predice sacarosa, sin afectar las respuestas hedónicas hacia ese sabor. Numerosa evidencia muestra que las respuestas compulsivas en general, que involucran diversos tipos de reforzadores como comida, juego, sexo, etc, responden a un desencadenamiento o disparo de este mecanismo, sin que medien respuestas de agrado del reforzador involucrado (Berridge et al., 2009).

El *impacto hedónico* se relaciona con la percepción de cuán placentero o displacentero resulta un sabor, dando cuenta del impacto emocional que un

sujeto le asigna (Berridge, 2000; Steiner, Glaser, Hawilo & Berridge, 2001). Mediante la implementación de una técnica de administración forzada, pero consumo voluntario de soluciones, se logró evaluar este segundo componente psicológico de un reforzador. Cuando un sabor se experimenta directamente en la boca, se reacciona de forma automática emitiendo un conjunto de respuestas orofaciales y motoras, que pueden cuantificarse objetivamente. Esta técnica se denominó Test de Reactividad al Sabor (TRS - Grill & Norgren, 1978a; 1978b). Desde su creación a la actualidad, una gran cantidad de trabajos señalan que al registrar estas conductas se puede identificar si un sabor produce gusto o disgusto más que señalar qué tipo de sabor se está recibiendo (Berridge, 2000).

En los siguientes apartados se expondrán estudios en los que se describe (1) el patrón de reacciones hedónico y aversivo y su expresión en diferentes especies mamíferas, (2) cómo estas respuestas pueden modificarse en función de experiencias previas o estados fisiológicos específicos, (3) su expresión durante la ontogenia de la rata y (4) las bases neurobiológicas que subyacen a este fenómeno. Cabe aclarar al lector que, en este capítulo así como a lo largo de la tesis, las respuestas de reacción al sabor en la rata se expresarán en inglés para facilitar su identificación y continuidad con los antecedentes que evaluaron este tópico.

Respuestas de reacción hedónicas y aversivas: Estudios comparados

Los primeros estudios que utilizaron el TRS señalaban que las conductas emitidas ante un sabor daban cuenta de aspectos puramente sensoriales. Bajo esta perspectiva, observando las respuestas ante los sabores, sería posible inferir qué sabor se está percibiendo y sería esperable observar un patrón específico de respuestas ante cada uno (Steiner, 1974). Una gran cantidad de trabajos indican que pueden delimitarse 2 grupos de respuestas ante los sabores (Ganchrow, Steiner & Daher, 1983; Grill & Norgren, 1978a; Hanson, Jojola, Rawson, Crowe & Laska, 2016; Jankunis & Whishaw, 2013; Kiefer, Hill & Kaczmarek, 1998; Rosenstein & Oster, 1988; Steiner & Glaser, 1984; Steiner et al., 2001; Ueno, Ueno & Tomonagac, 2004). Si consideramos los patrones de respuestas como un continuo, en un extremo

se ubican las respuestas hedónicas, que emergen generalmente ante sabores dulces como la sacarosa, sacarina o leche, reflejando patrones de ingesta y deglución. En el extremo opuesto se encuentran las respuestas aversivas, que surgen ante sabores amargos y expresan el rechazo de la solución recibida. Sabores ácidos o salados inducen respuestas intermedias en este continuo. Asimismo, existirían diferencias en cuanto a la duración e intensidad en la expresión las respuestas que integran cada patrón, observándose mayor intensidad y breve duración de las reacciones aversivas en comparación con las hedónicas (Steiner & Glaser, 1984).

El conjunto específico de respuestas que integran cada patrón varía según la especie que se estudie. Su expresión estaría principalmente determinada por la capacidad muscular, sensorial y los hábitos alimenticios de cada especie. Los trabajos de Ganchrow y cols. (1983) y Rosenstein y Oster (1988) constituyen los primeros estudios en los que se evaluó de forma sistemática los movimientos orofaciales y corporales de bebés humanos ante los sabores dulce, ácido, salado y amargo. En ambos trabajos se encontró que los bebés muestran relajación de los músculos de la cara (i. e., frente, cejas, ojos, nariz, mejillas y labios) acompañados de movimientos de succión, relameo de los labios y/o sonrisa cuando se les proporciona un sabor dulce. Por el contrario, los sabores ácido y amargo indujeron el patrón contrario, aperturas triangulares de la boca, elevación de las mejillas, elevación del labio superior, fruncimiento de la nariz, labios y cejas, babeo, movimiento de la cabeza hacia los lados y elevación de la cabeza. Tales trabajos sentaron las bases para la evaluación de las reacciones afectivas en estudios posteriores con bebés, ante sabores y olores (Faas et al., 2015; Mennella & Beauchamp, 2002; Mennella & Forestell, 2008; Mennella, Griffin & Beauchamp, 2004).

Patrones similares se observaron en grandes simios, una especie más próxima a los humanos en la rama evolutiva. Respuestas como sonrisas y relamerse los labios ante sabores dulces, fruncir los labios al percibir un sabor ácido o realizar movimientos complejos como arrugar cejas, ceño y nariz ante sabores amargos sólo se observaron en homínidos (Steiner et. al., 2001). A medida que nos vamos alejando en el árbol evolutivo de los primates, se encuentran características propias de cada especie. Por ejemplo, monos

macacos Rhesus emiten protrusiones linguales, tanto ante sabores dulces como amargos. Esta peculiaridad podría deberse a razones adaptativas dado que el repertorio de alimentos que forma parte de su dieta incluye un mayor contacto con sabores amargos (Ueno et. al., 2004).

En mamíferos no primates como el gato doméstico se halló que el patrón hedónico está integrado por protrusiones linguales, ojos a medio cerrar, lameteos del hocico y relameo de la boca. Por su parte, la respuesta de disgusto más saliente fue apertura triangular de la boca (i.e. gape en inglés - Hanson et al., 2016). Un estudio que evaluó las reacciones al sabor en caballos indica que al recibir sacarosa realizaron principalmente protrusiones linguales y movimiento de las orejas hacia adelante; mientras que las conductas características expresadas ante una solución de quinina fueron gapes, flexión de las orejas hacia atrás y amplia extensión de la cabeza hacia atrás (Jankunis & Whishaw, 2013).

La gran mayoría de las investigaciones en las que se utilizó el TRS se llevaron a cabo con ratas. El trabajo pionero de Grill y Norgren (1978a) describió minuciosamente las conductas que componen el patrón hedónico y el aversivo en ratas adultas. El patrón hedónico está conformado por movimientos orofaciales como movimientos rítmicos de la mandíbula y boca (i.e., mouth movement), protrusiones linguales mediales (tongue protrusions) y movimientos linguales hacia los laterales (lateral tongue movements). En cambio, el patrón aversivo integra movimientos orofaciales de aperturas triangulares de la boca (gaping) y corporales como frotar la barbilla contra el piso, proyectando el cuerpo hacia adelante (chin rubbing), sacudidas rápidas de la cabeza hacia los lados (head shaking), movimientos sucesivos de extensión de una de las patas delanteras hacia adelante y contra el piso mientras se retrae la otra hacía atrás (paw pushing o paw treading), movimientos circulares con ambas patas delanteras sobre el hocico (face washing) y sacudimiento rápido de las patas delanteras (flailing of the forelimbs). Algunos trabajos posteriores han reducido el patrón de respuestas aversivas a gaping, paw pushing y chin rubbing y han añadido al patrón hedónico el lameteo de las patas delanteras (paw licking - Arias & Chotro, 2005a; 2005b; 2006b; Limebeer & Parker, 2000; Parker, 1995; Parker & Leeb,

1994; Parker, Rana & Limebeer, 2008 – para un ejemplo de estos comportamientos ingresar a <https://www.youtube.com/watch?v=Qofqzo3jx50> y https://www.youtube.com/watch?v=7Zp-MKWxN_c).

Por otra parte, mediante la aplicación de *reglas de tiempo alométricas*, se determinó que algunas de las reacciones al sabor son universales a través de las especies. Estas reglas se basan en ecuaciones que ponen en relación el tamaño corporal del animal y la duración de una conducta. Aquellas respuestas altamente estereotipadas o rítmicas resultan más apropiadas para aplicarlas. Se encontró que la velocidad en la que se expresa una conducta es directamente proporcional al tamaño corporal. Por lo tanto, cuanto más pequeño es un animal, más rápida y breve es la expresión de la conducta (Berridge, 2000; Steiner et al., 2001). Ejemplo de esto se ve reflejado con la conducta tongue protrusions. En ratas, la duración aproximada de esta conducta es 120 milisegundos (Grill & Norgren, 1978a), mientras que en monos del nuevo mundo (e.g., mono tití) su duración es de 200 milisegundos y en grandes simios como el chimpancé alcanza los 850 milisegundos (Berridge, 2000).

Una estrategia para determinar si las respuestas de reacción al sabor reflejan valoraciones afectivas es observar si se modifican en función de experiencias previas con sabores, estados fisiológicos específicos (e.g., hambre, saciedad, deficiencia de sal) o tras vivenciar eventos emocionalmente significativos. Si un patrón típico de reacciones varía como consecuencia de tales manipulaciones, esto apoyaría la hipótesis de que la atribución que realiza un sujeto no sólo se basa en las propiedades sensoriales sino también en el impacto afectivo que genera un sabor específico. Por ejemplo, se reportó que bajo condiciones de hambre la expresión de respuestas hedónicas hacia una solución azucarada es mayor que en estado de saciedad (Berridge, 1991). Alteraciones fisiológicas en la homeostasis del cloruro de sodio (NaCl) también afectan las respuestas de reacción al sabor. Se encontró que bebés cuyas madres presentaban alta frecuencia de vómitos durante el embarazo mostraban menor cantidad de respuestas de disgusto ante una solución salina, en relación a lo expresado por bebés de madres con ausencia o baja frecuencia de vómitos durante el embarazo. Tal resultado sugiere que la

deshidratación ocasionada por el vómito durante la preñez induce preferencia por sabores salados en etapas posnatales (Crystal & Bernstein, 1998). Gavalerna, Seeley, Berridge, Grill, Epstein y Schulking (1993) evaluaron las respuestas de reacción al sabor de ratas adultas en estado de homeostasis y depleción sódica. Hallaron que la deficiencia de sal inducida farmacológicamente produce un aumento de las respuestas hedónicas y disminución de las aversivas ante una solución de NaCl, mientras que en condiciones de homeostasis induce el patrón inverso, es decir baja expresión de respuestas hedónicas y mayor cantidad de respuestas de disgusto. Se observaron resultados similares al comparar ratas alimentadas con una dieta normal vs. un régimen bajo en sal. Los animales alimentados con este último régimen mostraron mayores respuestas hedónicas y menores respuestas de disgusto al recibir una solución salina, en comparación a cuando la recibieron en estado de homeostasis sódica (Flynn, Grill, Schulkin, & Norgren, 1991). Tindell, Smith, Peciña, Berridge y Aldridge (2006) reportaron que cuando ratas adultas recibieron una solución fuertemente salada (i.e., agua del mar muerto) en estado de depleción sódica triplicaron la cantidad de reacciones hedónicas en comparación a las emitidas en condiciones de homeostasis. Asimismo, se observó que la frecuencia de estas respuestas alcanzó niveles equiparables a aquellas inducidas por una solución de sacarosa.

Varios trabajos indican que las reacciones ante un sabor pueden modificarse en función de *manipulaciones psicológicas*. Esto significa que sabores que inicialmente se valoraban como placenteros pueden percibirse como desagradables luego de experimentar situaciones emocionalmente significativas. Un ejemplo de esto es lo que sucede con el condicionamiento de aversión al sabor. En este protocolo se asocia generalmente un sabor dulce con un malestar gástrico inducido por una inyección de LiCl. Luego de 24 hs. se evalúan las respuestas hacia la solución dulce. Utilizando el TRS en ratas adultas se halló que las respuestas de disgusto (e.g., chin rubb, gape y paw tread) aumentan de forma significativa ante una solución dulce que fue previamente apareada con LiCl (Gavalerna et.al., 1993; Itoga, Berridge & Aldridge, 2016; Parker & MacLeod, 1991; Rana & Parker, 2008). Un patrón similar se observó en ratas predestetadas. Independientemente de que se haya

utilizado LiCl (Arias et. al., 2010; Hoffman, Hunt & Spear, 1991) o etanol (Pautassi et. al., 2008) como agente tóxico, las crías mostraron un aumento de las respuestas de rechazo (e.g. wall climbing y head shake) y disminución de la respuesta de mouthing ante la solución de sacarina. Por otra parte, tanto en animales adultos como en infantes se encontró que la aplicación de una droga antiemética previa al condicionamiento de aversión al sabor, anula la expresión del patrón de rechazo hacia la solución dulce (Parker & MacLeod, 1991; Pautassi et. al., 2008). En algunos casos, la aplicación de un agente externo no es imprescindible para obtener estos resultados. Grant et. al. (2012) permitieron a ratas adultas correr en una rueda luego de consumir una solución de sacarina y subsecuentemente registraron sus respuestas de reacción al sabor ante dicha solución. Los animales que fueron expuestos a este tratamiento mostraron respuestas de disgusto condicionadas hacia la sacarina, dada la asociación del sabor con el malestar producido por el movimiento de balanceo al finalizar la actividad en la rueda.

Los trabajos presentados hasta aquí indican que las respuestas de reacción al sabor pueden agruparse en 2 conjuntos opuestos, hedónico y aversivo, los cuales se expresan ante sabores dulces y amargos respectivamente. Estos patrones se encontraron en una amplia especie de mamíferos y se pudo determinar que, si bien existen reacciones propias a cada especie, algunos de sus componentes son universales. Por otra parte, los estudios donde se realizaron manipulaciones fisiológicas y/o psicológicas sugieren fuertemente que estas respuestas dan cuenta de valoraciones afectivas que se asignan a los reforzadores y que, por lo tanto, las dimensiones hedónicas y aversivas son dinámicas, variando en función de los aprendizajes previos y de las condiciones fisiológicas de los sujetos. Cabe aclarar que en algunos de los trabajos expuestos no solo se midieron las respuestas de reacción al sabor (i.e., liking) sino también el consumo (i.e. wanting). No obstante, puesto que el foco principal de este capítulo es dar cuenta del TRS como medida confiable para medir procesos afectivos, solo se expusieron los resultados en relación a este aspecto. Como se expuso al inicio del capítulo, el hecho que las respuestas de reacción al sabor varíen luego de ciertas

manipulaciones no implica un cambio correlativo en el consumo (Berridge et al., 2009; Limbeer & Parker, 2000; Parker, 1995; Parker & MacLeod, 1991).

Hasta aquí se han expuesto los trabajos que utilizaron el TRS en animales adultos. En el siguiente apartado se expondrán los antecedentes en lo que se usó esta medida en diferentes momentos de la ontogenia, marcando posibles diferencias con sujetos maduros.

Test de reactividad al sabor durante la ontogenia

Los estudios con humanos sugieren que la exposición temprana a sabores impacta sobre su aceptación y las reacciones orofaciales asociadas a tales estímulos en etapas posteriores del desarrollo. Mennella y Beauchamps (2002) encontraron que niños de 4-5 años que fueron alimentados con hidrolizado de proteínas (leche de fórmula con sabor amargo-ácido) durante los primeros meses de vida, mostraban menor cantidad de reacciones de disgusto y mayor predisposición a consumir alimentos con sabores ácidos (e.g., jugo de manzana mezclado con jugo de limón) y amargos (e.g. brócoli) en comparación con niños alimentados con leche regular. Resultados similares se encontraron al controlar más rigurosamente la historia de alimentación previa de los infantes. Mennella, Griffin y Beauchamp (2004) reclutaron a madres con bebés menores a tres semanas de vidas, alimentaron a sus niños con leche de fórmula que contiene un intenso sabor amargo (i.e., hidrolizado de proteínas) o leche regular. Al cabo de 7 meses se evaluó el consumo y las respuestas orofaciales hacia cada sabor. Se halló que los bebés alimentados a base de hidrolizado de proteínas mostraron mayor consumo y menor respuestas de disgusto ante el sabor de este alimento, en comparación con aquellos que fueron alimentados en base a leche regular. Los alimentos ingeridos por la madre durante el embarazo y la lactancia también afectan dichas respuestas. Los olores y sabores de los alimentos se transmiten al bebé a través del líquido amniótico y la leche, constituyendo sus primeras experiencias con estímulos quimio-sensoriales. Varios estudios mostraron que el consumo de la madre de frutas y vegetales (Mennella & Forestell, 2008; Mennella, Jagnow & Beauchamp, 2001) e incluso de cantidades moderadas de alcohol (Faas et al., 2015; Mennella & Beauchamp, 1998b; Mennella & García, 2000) durante la

gestación y el amamantamiento afecta las respuestas hedónicas de los niños, en etapas posteriores hacia a tales estímulos.

Estudios con modelos animales reportan hallazgos similares. En una serie de experimentos Arias y Chotro (2005a; 2005b) administraron por vía intragástrica alcohol (2 g/kg) o agua destilada a hembras preñadas. Al DP 14 evaluaron el consumo y las respuestas de reacción al sabor de las crías hacia el alcohol o una solución de sacarosa-quinina que emula su sabor (Kiefer, Bice, Orr & Dopp, 1990). Los autores mostraron que los animales pre-expuestos al alcohol incrementaron el consumo de etanol y de la solución que emula su sabor a la vez que mostraron mayor palatabilidad hacia estas sustancias, en comparación con las crías que recibieron agua destilada durante la gestación. Específicamente, se observó un aumento de mouthing y paw lick así como una disminución de la actividad general y wall climbing (i.e., apoyar las patas delanteras sobre la pared, sosteniéndose sobre las patas traseras) en las crías pre-expuestas. Díaz-Cenzano y Chotro (2010a) encontraron que este patrón hedónico hacia el etanol por pre-exposición a la droga se observa si la administración se realiza en el día gestacional 19-20, pero no si se suministra al 17-18. Por otra parte, cuando se administró 3 g/kg de etanol a crías de DP 7-8 y se las evalúa 3 días después, nuevamente se halló un incremento del consumo y de las respuestas apetitivas, así como una disminución de las respuestas de disgusto (Arias & Chotro, 2006a).

Si bien el TRS también se utilizó durante etapas tempranas de la ontogenia de la rata, los estudios descriptivos y que evalúan el desarrollo de la expresión de las respuestas de reacción al sabor durante esta etapa son escasos. Hall y Bryan (1981) evaluaron las respuestas de mouthing, chin rubb y paw tread en crías de DP 3, 6, 9, 12 y 15 ante soluciones de sacarosa, quinina y agua. Sus resultados indican que, en todas las edades, cuando los animales obtuvieron sacarosa incrementaron la conducta de mouthing en comparación a cuando recibieron agua. Esta diferencia solo se observó a partir del DP 9 cuando la solución fue quinina. Al comparar las respuestas de disgusto chin rubb y paw tread frente a la solución de quinina vs agua, se hallaron diferencias significativas solo a partir del DP 12. En otro estudio se midieron las respuestas de mouthing, face washing, wall climbing y paw treading en ratas de DP 5 y 15

frente a una solución de sacarosa que previamente fue asociada a un malestar gástrico. Se halló que al DP 5 las crías solo expresan una disminución de mouthing. Mientras que al DP 15, se observó que además hay un incremento de wall climbing y paw treading (Hoffman et al., 1991). Otros trabajos sugieren que respuestas diferentes a las típicamente evaluadas en animales adultos, tales como apoyar las patas delanteras sobre la pared, sosteniéndose sobre las patas traseras (wall climbing) o acumular la solución infundida en la boca y dejarla caer en ausencia de movimiento (passive drips), constituyen reacciones de disgusto fiables en ratas predestetadas (Arias & Chotro, 2005a; 2005b; 2006b; Arias, Pautassi, Molina & Spear, 2010; Díaz-Cenzano & Chotro, 2010a; 2010b; Hoffman et al., 1991; Pautassi et al., 2008; Schwartz & Grill, 1985).

Estos antecedentes nos advierten sobre la importancia de aumentar las investigaciones hacia trabajos más abarcativos que contemplen un amplio espectro de conductas, así como los aspectos ontogenéticos que determinan su expresión. En edades muy tempranas del desarrollo, los aspectos madurativos podrían afectar la motricidad fina de las crías para expresar conductas tales como paw pushing. Es posible que los animales no sean capaces de desplegar tales comportamientos o que los realicen de una forma cualitativamente diferente a como los expresan los animales adultos (Schwartz & Grill, 1985). Por ello, resulta de interés contar con estudios que describan exhaustivamente estos tópicos.

Mecanismos neurobiológicos de las respuestas de reacción al sabor

Algunos trabajos recientes realizados principalmente en ratas adultas permitieron delimitar las áreas cerebrales que correlacionan con el wanting y el liking. Mientras que para el wanting, los sistemas implicados se encuentran ampliamente distribuidas en el cerebro y en ocasiones se superponen con aquellos implicados en el liking, como por ejemplo el sistema límbico en general y la transmisión dopaminérgica (ver Berridge et al., 2009 y Castro & Berridge, 2014), las estructuras que subyacen al liking se circunscriben principalmente al área rostromedial del caparazón del núcleo accumbens y la zona caudal del pálido ventral (Cromwell & Berridge, 1993; Peciña & Berridge, 2005; Tindell et al., 2006).

Un trabajo reciente realizado en humanos sugiere que el núcleo accumbens y pálido ventral se activan diferencialmente ante el liking y wanting durante estados de hambre y saciedad. Jiang y cols., (2015) expusieron a mujeres adultas a olores de comida y otro tipo de olores (e.g., pasto, tabaco, flores) quienes debieron puntualizar, por un lado, cuan placentero les resultaba cada olor (evaluación de liking) y, por otro, el deseo de comer que le inducían los olores de comida (evaluación de wanting). Mientras realizaban estas puntualizaciones se registraba la actividad cerebral mediante resonancia magnética funcional. Se encontró que ante los olores de comida hubo una mayor activación del núcleo accumbens durante la valoración del liking en comparación a lo ocurrido con el wanting, cuando las personas estaban hambrientas. El patrón contrario se halló cuando se evaluó a las personas en estado de saciedad, esto es, menor activación del núcleo accumbens durante la tarea de liking. Complementariamente, se observó que en estado de hambre el valorar el wanting indujo mayor activación del pálido ventral que durante la evaluación del liking.

La mayoría de los trabajos que exploraron estos tópicos se llevaron a cabo en ratas adultas. En los inicios se realizaron lesiones de áreas implicadas o conectadas con el sistema gustativo como por ejemplo el sistema límbico, principalmente la amígdala, dado que posee grandes conexiones con el sistema gustativo central. Sin embargo, las lesiones bilaterales del núcleo central de la amígdala (Gavalerna et. al., 1993; Rana & Parker, 2008) y de la amígdala basolateral (Rana & Parker, 2008) no afectaron las respuestas de reacción al sabor hacia ninguno de los sabores básicos (i.e., salado, dulce, ácido, amargo) ni hacia las evocadas por manipulaciones psicológicas. Lesiones de zonas próximas al sistema límbico como el hipotálamo lateral, globo pálido y pálido ventral mostraron que solo el daño en esta última área produjo un aumento de las respuestas de aversión hacia la sacarosa (Cromwell & Berridge, 1993). La sofisticación de las técnicas de medición neurobiológicas permitió en años recientes determinar que el pálido ventral constituye un área necesaria para la expresión de las respuestas hedónicas. Por ejemplo, microinyecciones de un agonista opioide en la mitad posterior del pálido ventral aumentaron las respuestas hedónicas hacia la sacarosa, mientras que la

estimulación con la misma droga en zonas anterior y central suprimieron dichas respuestas (Smith & Berridge, 2005). Asimismo, tanto lesiones como inactivaciones farmacológicas realizadas en la mitad posterior de esta estructura indujeron fuertes respuestas aversivas ante la sacarosa (Ho & Berridge, 2014). Complementariamente, estudios en los que se midió la actividad neuronal reportaron una alta tasa de disparo de las neuronas de esta área cuando los animales recibieron infusiones intraorales de sacarosa, en comparación a cuando recibieron soluciones aversivas (Itoga et al., 2016; Tindell et. al., 2006). Por otra parte, la actividad neuronal en el área caudal del pálido ventral también refleja el impacto hedónico relativo de los sabores. Se halló que la amplitud del disparo neuronal se duplica cuando un sujeto en estado de depleción sódica recibe infusiones de NaCl (Tindell et. al., 2006) y disminuye significativamente al recibir sacarosa luego de un condicionamiento de aversión al sabor (Itoga et. al., 2016).

Otra estructura que juega un rol importante en la expresión del liking es el caparazón del núcleo accumbens. De forma similar a lo que sucede con el pálido ventral, la estimulación farmacológica en las zonas rostrales y caudales afectan diferencialmente las respuestas de reacción al sabor. Peciña y Berridge (2005) informaron que microinyecciones de un agonista opioide en la zona rostródorsal del área media del caparazón del núcleo accumbens amplifica las respuestas hedónicas hacia los sabores dulces. Se obtuvieron resultados similares al estimular la misma región con microinyecciones de un agonista GABAérgico (Reynolds & Berridge, 2002) o mediante la aplicación intraperitoneal de un agonista de receptores benzodiazepínicos (Cooper & Ridley, 2005). Por otra parte, la aplicación de un agonista de GABA en la mitad caudal de la zona medial del caparazón del núcleo accumbens produjeron un aumento de las respuestas de disgusto hacia la sacarosa (Ho & Berridge, 2014; Reynolds & Berridge, 2002). Sin embargo, la lesión de esta área no afectó las respuestas de reacción al sabor (Ho & Berridge, 2014).

Como se mencionó antes, la aplicación de agonistas opioides y GABA amplifican las respuestas hedónicas hacia una solución dulce. Interesados en estudiar si ambos sistemas interactúan en la expresión de estas reacciones, Richardson, Reynolds, Cooper y Berridge (2005) aplicaron inyecciones

intraperitoneales de vehículo, diazepam (agonista GABA), naltrexona (antagonista opioide) o diazepam + naltrexona a ratas adultas, previo a la infusión de una solución de sacarosa-quinina. Hallaron que el diazepam aumenta las respuestas hedónicas y disminuye las conductas de disgusto hacia el compuesto sacarosa-quinina, en relación a lo expresado por los sujetos que recibieron el vehículo. La aplicación del antagonista opioide naltrexona revirtió el efecto inducido por el diazepam. Los resultados sugieren que ambos sistemas, opioide y GABA, interactúan en la expresión de las respuestas de reacción al sabor.

Conclusiones

El recorrido de los antecedentes expuestos en este capítulo da cuenta de que el TRS constituye una herramienta objetiva y fiable para evaluar aspectos emocionales de los reforzadores, mediante el cual el concepto de liking adquiere entidad propia y distinguible de la búsqueda y consumo del reforzador (wanting). Esta afirmación no solo se apoya en la gran cantidad de trabajos en diferentes especies mamíferas en los cuales se registraron las respuestas de reacción al sabor y dan cuenta de la universalidad de alguno de sus componentes, sino también en los estudios neurobiológicos que permitieron delimitar las áreas cerebrales implicadas en este fenómeno.

Un aspecto imprescindible a la hora de establecer que las reacciones hacia los sabores dan cuenta de procesos emocionales o afectivos, es la de observar modificaciones en su expresión como consecuencia de haber experimentado situaciones emocionalmente significativas. Berridge (2000) denomina estas situaciones como casos de manipulación psicológica dado que el mero hecho de vivenciar un evento significativo involucrando reforzadores impactará sobre la valoración hedónica posterior de dicha recompensa. Esta descripción de lo que implica una manipulación psicológica se corresponde con lo que acontece en una situación de devaluación del incentivo. Como se mencionó en el capítulo III, obtener algo peor a lo que se esperaba constituye una situación aversiva que desencadena reacciones fisiológicas similares al estrés y el miedo (Daly, 1974; Mustaca et al., 2009; Papini & Dudley., 1997). Este estado emocional se traduce en una supresión consumatoria activa del

reforzador devaluado, que no puede ser explicado por un incremento de respuestas alternativas de la búsqueda del reforzador (López-Seal, Cuenya, Suárez & Mustaca, 2013). Dado que esto surge de la comparación de dos soluciones apetitivas, uno podría preguntarse si experimentar una situación frustrante resulta un evento lo suficientemente saliente como para impactar sobre la valoración hedónica de un reforzador devaluado. La utilización del TRS en un protocolo de contraste consumatorio es inexistente en la literatura. Sin embargo, su aplicación podría aportar a las discusiones teóricas tanto en lo que respecta a las respuestas de reacción al sabor como a la devaluación del incentivo. En cuanto a las reacciones al sabor, si estas se modifican en función de experimentar frustración aportaría nueva evidencia empírica de que efectivamente la expresión de estos comportamientos da cuenta de valoraciones afectivas. Al mismo tiempo, la utilización de tal protocolo se establecería como una estrategia más de manipulación psicológica. En lo que respecta a la devaluación del incentivo, nutriría aquellas teorías que sostienen que durante una situación de contraste prima el componente afectivo (Amsel, 1958, 1992).

En la presente tesis, las adaptaciones metodológicas que se debieron realizar para la evaluación de fenómenos paradójicos consumatorios en ratas pre-destetadas (ver Capítulo V) incorporó dentro de sus objetivos principales el registro de las respuestas de reacción al sabor (Capítulo VI). El paradigma de infusión forzada, pero consumo voluntario resulta un procedimiento adecuado para la evaluación de ambos fenómenos (i.e., respuestas de reacción al sabor y consumatorias ante la devaluación del incentivo) y su utilización en ratas pre-destetadas constituye una estrategia menos invasiva a la que implica en animales adultos, ya que no requiere de una cirugía para implantar la cánula. En ese sentido esta tesis aporta nueva información dado que introduce medidas novedosas para evaluar el impacto afectivo que produce la devaluación sorpresiva de un reforzador.

Capítulo V

Establecimiento de Parámetros

Cuando se desarrollan modelos animales para etapas tempranas de la ontogenia, generalmente no resulta conveniente utilizar las mismas preparaciones que para animales adultos. Es necesario realizar adaptaciones para la etapa del desarrollo en estudio, y si esto no es posible, se deben desarrollar nuevas técnicas que sean específicas para cada edad. Esto es debido a que el funcionamiento del sistema nervioso en etapas tempranas no constituye una versión inmadura del adulto, sino que algunos mecanismos involucrados en el aprendizaje son diferentes en la infancia, la adolescencia y la adultez. Asimismo, los estímulos que son sumamente relevantes durante la infancia pueden no ser cruciales para la supervivencia en la adultez. Por ejemplo, los estímulos olfatorios constituyen la base de los aprendizajes más relevantes en las primeras etapas de la vida en los mamíferos, ya que son fundamentales para la supervivencia. En etapas posteriores del desarrollo, dejan de tener tal relevancia, aunque dichos aprendizajes previos pueden influir en el comportamiento aún hasta la adultez (Shah et al, 2001).

La evaluación de los efectos paradójicos durante la ontogenia utilizando un protocolo consumatorio es escasa. En este sentido fue indispensable implementar una técnica adecuada y establecer los parámetros necesarios para alcanzar tal propósito. En ratas adultas, la evaluación de fenómenos consumatorios implica el acercamiento y consumo voluntario de soluciones contenidas en un bebedero. En ratas pre-destetadas dicha metodología resulta difícil de aplicar dado que las crías nacen con los conductos auditivos y visuales cerrados y su marcha es errática, principalmente durante las primeras dos semanas de vida. Por lo tanto, la metodología a utilizar durante esta etapa debía contemplar estas peculiaridades. Es por ello que en esta tesis se utilizó un paradigma mediante el cual las crías recibieron las soluciones directamente en la cavidad oral, pero tenían la posibilidad de consumirlas o rechazarlas voluntariamente.

En este capítulo se expondrán los estudios experimentales que se llevaron a cabo para determinar patrones de consumo, las concentraciones de

soluciones de sacarosa que constituirán los reforzadores de mayor y menor magnitud en los subsecuentes testeos, establecimiento de la cantidad de ensayos y el tiempo de intervalo entre ensayos necesarios para la evaluación de los fenómenos estudiados. Por este motivo, si bien la metodología general de los experimentos se basó en la descripta previamente, en cada estudio experimental se describirá con mayor detalle el diseño utilizado.

Experimento 5. Determinación de patrones de consumo en ratas de DP 8 a

10

Introducción. En ratas adultas habitualmente se utiliza como reforzador de alta magnitud, una solución de sacarosa al 32% (p/v). Sin embargo, fue necesario explorar los parámetros de preferencias en las ratas infantiles, utilizando soluciones que no sean demasiado viscosas para permitir el correcto fluir a través de las cánulas. Las mismas tienen un diámetro pequeño y podrían verse obstruidas con las concentraciones de sacarosa utilizadas en las ratas adultas. El objetivo de este experimento fue principalmente determinar los patrones de ingesta de diferentes concentraciones de soluciones de sacarosa en ratas de DP 8-10.

Procedimiento. Se utilizaron 19 ratas hembras Wistar, representativas de 5 camadas, de DP 8 al comienzo del experimento. El entrenamiento consistió de dos fases: 2 ensayos de precambio (DP 8-9) y 1 de poscambio (DP 10), con un intervalo entre ensayos de 24 hs. En la primera fase las crías recibieron una solución azucarada al 12% (Grupo 12-2), 10%, (Grupo 10-2), 5% (Grupo 5-2), ó 2% (Grupo 2-2), en tanto que en la fase de poscambio todos los animales recibieron la solución al 2%. Las nomenclaturas de los grupos remiten a la solución recibida en cada fase. Las soluciones se prepararon diluyendo 12, 10, 5 o 2 gr de sacarosa en 100 ml de agua. La tabla 6 resume el diseño experimental empleado.

Grupo	N	Precambio 2 ensayos DP 8-9	Poscambio 1 ensayo DP10
12-2	6	12 %	2 %
10-2	5	10 %	2 %
5-2	4	5 %	2 %
2-2	4	2 %	2 %

Tabla 6. Esquema del diseño del Experimento 5.

Resultados y discusión. En la Figura 10 se grafica el porcentaje de ganancia de peso en función de los ensayos. Se observa que durante la fase de precambio los animales que recibieron reforzadores de mayor magnitud mostraron un porcentaje de ganancia de peso significativamente mayor que los que recibieron soluciones de menor concentración. Los resultados del ANOVA confirman esta observación. En la fase de precambio se realizó un ANOVA con un factor intersujeto (Grupo) y un factor intrasujeto (Ensayos 1 y 2). Se halló un efecto principal de Grupo, $F(3, 15) = 5.47, p < 0.009$. No se halló efecto principal de Ensayo ni la interacción de ambos factores ($p > 0.05$). Para conocer las fuentes de las diferencias del factor Grupo, se realizaron comparaciones pos-hoc con LSD Fisher. Este análisis arrojó diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo 12-2 vs Grupo 10-2 ($p < 0.04$), así como con el Grupo 2-2 ($p < 0.001$) y marginalmente significativa con el Grupo 5-2 ($p < 0.06$) en el ensayo 2. El resto de los grupos no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p > 0.05$). Para la fase de poscambio se realizó un ANOVA de un factor intersujeto (Grupo 12-2, 10-2, 5-2 y 2-2). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p > 0.05$).

En resumen, este experimento muestra la existencia del EMRAc, que se evidencia en el segundo ensayo de adquisición. Este efecto se caracteriza por un consumo diferencial durante la fase de adquisición, en función directa al valor absoluto del reforzador (i.e., concentración de sacarosa recibida). La falta de diferencias entre grupos durante el poscambio indica la ausencia de CNSc en ratas infantiles de DP 8-10, bajo los parámetros utilizados. Este hecho no

puede atribuirse a una incapacidad para responder en función de las diferentes concentraciones ya que se constató un consumo diferencial en función de las concentraciones de sacarosa. Los resultados sugieren que a esta edad y bajo los parámetros utilizados los animales responden en función del valor absoluto del incentivo.

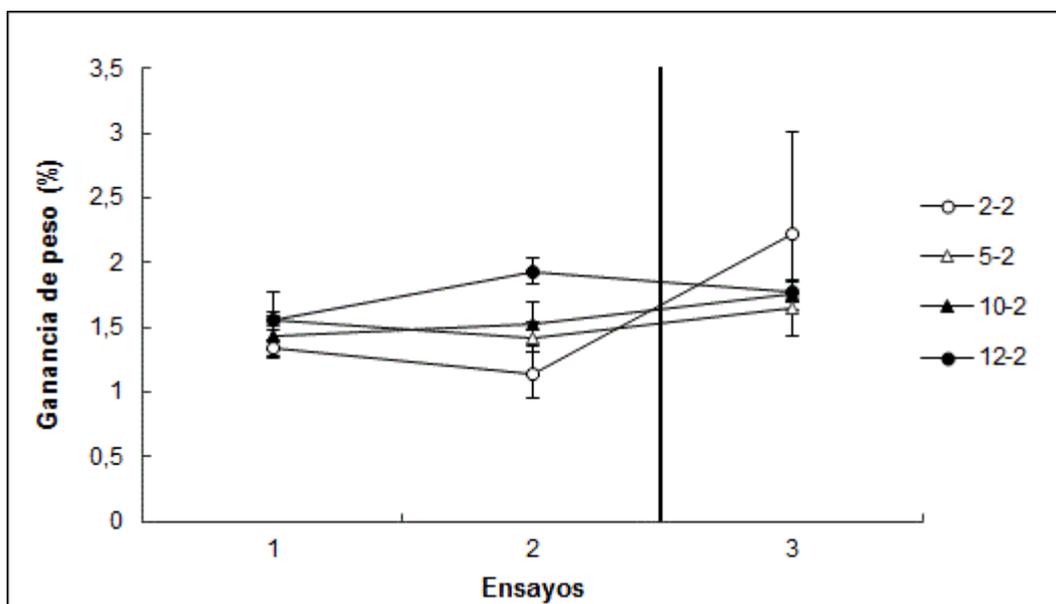


Figura 10. Porcentaje de ganancia de peso promedio (\pm ETM) de cada uno de los grupos, en función de los ensayos. La línea vertical negra entre los ensayos 2 y 3 indica el cambio de fase entre precambio y poscambio.

Experimento 6: Evaluación de EMRAc y EMREc (DP 7-12)

Introducción. Como se señaló en el capítulo II, el EMRE es uno de los efectos paradójicos del reforzamiento. Brevemente, se define por la presencia de una extinción más rápida de la conducta en el grupo que recibió un reforzador de mayor magnitud durante la adquisición, en comparación a un grupo control que obtuvo un reforzador de menor magnitud en la misma fase. Este efecto, así como el EMRA, se evaluaron con protocolos instrumentales por Amsel y su equipo, encontrando que el EMRA se expresa al DP 11 (Stanton & Amsel, 1980) y el EMRE al DP 18 (Brudette et. al., 1976). Este experimento tuvo como objetivo replicar el EMRAc a una edad menor (DP 7-8) a lo encontrado en el Experimento 5 y evaluar la expresión del EMRE consumatorio (EMREc) en ratas de DP 11-12. Como reforzadores de mayor y menor

magnitud se usaron las dos concentraciones de solución azucarada que mostraron diferencias más acentuadas entre sí en el Experimento 5: 12% y 2%.

Procedimiento. Se utilizaron 31 ratas hembras Wistar de DP 7 al comienzo del experimento, representativas de 9 camadas. Los sujetos se dividieron en dos grupos en función de la concentración de sacarosa recibida en la fase de adquisición: 12% (Grupo 12-0) y 2% (Grupo 2-0). La fase de adquisición constó de 4 ensayos (uno por día), mientras que la de extinción tuvo 2 ensayos (uno por día). Esta fase comenzó 24 hs. después del último ensayo de adquisición. Los protocolos que incluyen una fase de extinción, usualmente evalúan la respuesta del animal ante la ausencia del reforzador. Sin embargo, dado que la medida dependiente utilizada requiere la infusión de fluidos, las crías recibieron agua (i.e., 0% de sacarosa) durante la extinción. Estudios no publicados de nuestro laboratorio mostraron que la presencia o no de agua en un bebedero no alteraba los patrones de extinción, cuando se utilizaba tiempo de contacto con el bebedero como medida dependiente. Los restantes detalles de procedimiento siguen los lineamientos de la metodología general.

Grupo	N	Fase de adquisición	Fase de extinción
		4 ensayos DP 7-10	2 ensayos DP 11-12
12-0	15	12% (sacarosa)	0 % (agua)
2-0	16	2% (sacarosa)	0 % (agua)

Tabla 7. Esquema del diseño del experimento 6.

Resultados y discusión. En la figura 11 se muestra el porcentaje de ganancia de peso en función de los ensayos de las fases de adquisición y extinción. Se observa que durante la fase de adquisición los animales muestran un incremento del porcentaje de ganancia de peso corporal a lo largo de los ensayos, observándose mayores medidas en aquellos que reciben 12% (i.e., EMRAc). Durante la extinción se observa una caída abrupta del porcentaje de ganancia de peso en los dos grupos durante el primer ensayo y un aumento en el segundo ensayo. El ANOVA de la fase de adquisición arroja un efecto principal de Grupo, $F(1, 27) = 11.67$, $p < 0.002$, y de Ensayo $F(3, 81) = 18.67$,

$p < 0.0001$. No se halló un efecto de interacción entre ambos factores ($p > 0.05$). El ANOVA de la fase de extinción arroja un efecto principal de Ensayo, $F(1, 29) = 15.97$, $p < 0.0005$ y la interacción entre ambos factores, $F(1, 29) = 4.94$, $p < 0.03$. Un análisis ensayo por ensayo de esta fase, mostró solo una diferencia marginalmente significativa en el ensayo 6 ($p < 0.055$). El Grupo 2-0 exhibió mayor consumo de agua que el Grupo 12-0 en el segundo ensayo de extinción. Los datos indican nuevamente que las crías consumen las soluciones azucaradas en función del valor absoluto del reforzador durante la fase de adquisición (EMRAc) y que en la fase de extinción hubo una ausencia de EMREc, bajo los parámetros utilizados.

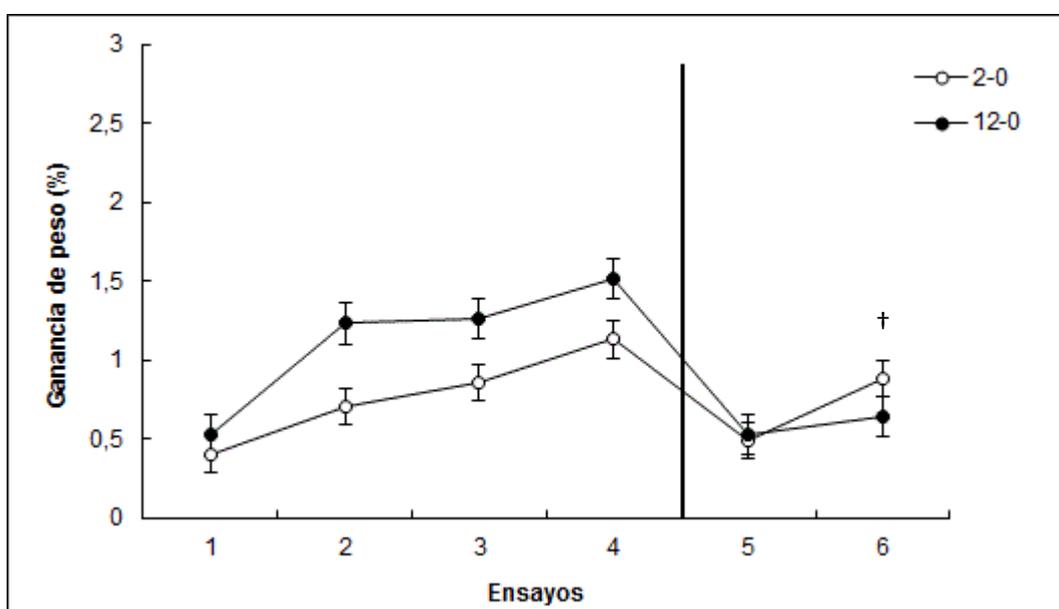


Figura 11. Porcentaje de ganancia de peso promedio (\pm ETM) del Grupo Control (puntos blancos) y Grupo Experimental (puntos negros), en función de los ensayos. La línea vertical negra indica el cambio de fase entre la adquisición y extinción. † $p < .06$.

Experimento 7. Evaluación del CNSc: Aumento de ensayos y edad (DP10-14)

Introducción. El CNSc consiste en una supresión activa del consumo de una solución de baja concentración de sacarosa por parte de un Grupo Experimental, tras haber recibido previamente en sucesivos ensayos una solución de sacarosa en alta concentración. Durante esta fase de precambio de solución, los animales muestran una curva de aprendizaje de la conducta

consumatoria durante la cual se formaría la expectativa de recibir dicha solución en un contexto determinado. En ese sentido es importante contar con cierta cantidad de experiencia para garantizar la generación de expectativas. El propósito del Experimento 7 fue evaluar el CNSc variando dos parámetros respecto al Experimento 5: la edad de los animales (DP 10 a 14) y la cantidad de ensayos en la fase de precambio.

Procedimiento. Se utilizaron 28 ratas hembras Wistar de DP 10 al comienzo del experimento, representativas de 7 camadas. Se emplearon 2 grupos: Grupo 12-2 y Grupo 2-2. La fase de precambio constó de 4 ensayos, a razón de uno por día. La fase de poscambio se realizó 24 hs. después del último ensayo de la fase de precambio en el cual los dos grupos recibieron 2% de solución de sacarosa. El resto del procedimiento siguió los lineamientos de la metodología general.

Grupo	N	Precambio 4 ensayos DP 10-13	Poscambio 1 ensayo DP 14
12-2	14	12%	2%
2-2	13	2%	2%

Tabla 8. Esquema del experimento 7.

Resultados y discusión. En la figura 12 se muestra el porcentaje de ganancia de peso en función de los ensayos de pre y poscambio. Durante la fase de precambio los animales parecen incrementar su consumo de manera gradual a lo largo de las sesiones, siendo el consumo aparentemente mayor en los animales que reciben 12% hacia el final de la fase de precambio. Estas impresiones fueron confirmadas por un ANOVA, que estuvo compuesto de un factor intersujeto (Grupo) y un factor intrasujeto (Ensayos 1 a 4) en la fase de precambio. Se halló un efecto principal de Grupo $F(1, 19) = 4.45, p < 0.04$, y de Ensayo $F(3, 57) = 6.71, p < 0.0005$. No se halló un efecto de interacción entre ambos factores ($p > 0.05$).

En la fase de poscambio, un ANOVA de un factor intersujeto (Grupo 12-2 vs. Grupo 2-2) no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p > 0.05$). Este resultado replica el EMRA en la fase de precambio y

muestra un efecto de ensayo, lo que permite inferir que los animales optimizan el consumo en función de los ensayos. La falta de diferencias entre los grupos durante la fase de poscambio, indica ausencia de CNSc. Al igual que en el Experimento 5, el Grupo Experimental no mostró un decremento del consumo durante el ensayo de devaluación del reforzador.

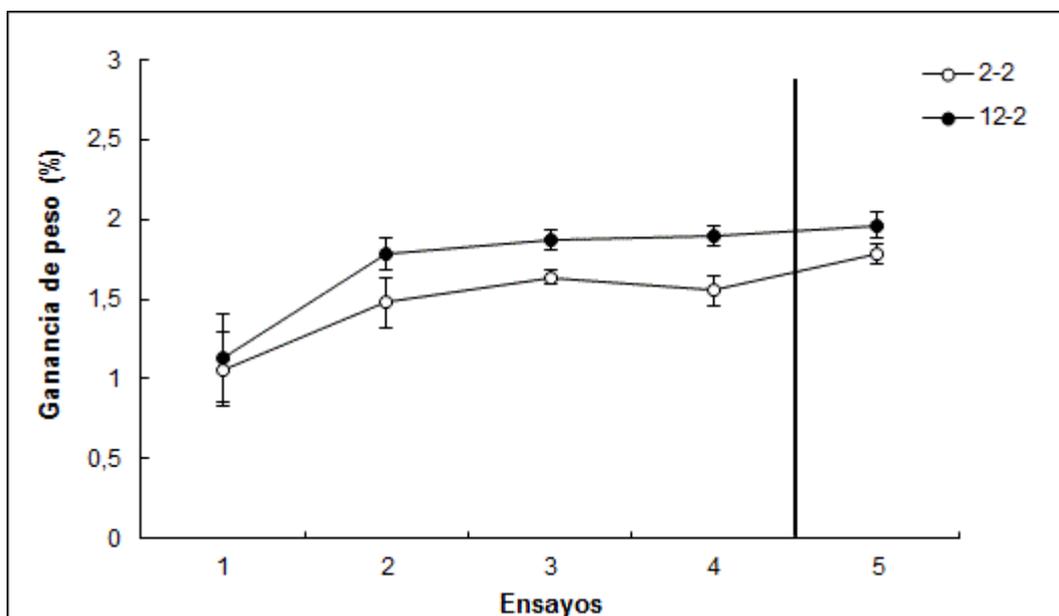


Figura 12. Porcentaje de ganancia de peso promedio (\pm ETM) del Grupo Control (puntos blancos) y Grupo Experimental (puntos negros), en función de los ensayos. La línea vertical negra entre los ensayos indica el cambio de fase entre el precambio y poscambio.

Discusión general

En conjunto, los resultados de estos experimentos indican que los animales de DP 8, 9 y 12 expresan EMRAc, ya que son capaces de responder de manera diferencial en función de distintas concentraciones de agua azucarada, mostrando mayor porcentaje de ganancia de peso con la solución al 12%, entre todas las soluciones presentadas. Además, puede observarse un efecto de aprendizaje de la respuesta consumatoria, ya que la ganancia de peso va aumentando en función de los ensayos. En el Experimento 5 se pudo observar que logran responder de manera diferencial entre soluciones de sacarosa al 12% de las del 10%, 5% y 2%. Además, en todas las edades las crías requirieron de experiencia previa con el reforzador para evidenciar EMRAc, ya que este fenómeno fue más marcado a partir del segundo ensayo

de adquisición. Es posible también que los animales necesiten habituarse al procedimiento de infusión intraoral, el cual puede tener elementos aversivos propios (véase Pautassi, Melloni, Ponce & Molina, 2005). Stanton y Amsel (1980) hallaron evidencias de EMRA con un procedimiento instrumental al DP 11. Sin embargo, los resultados de esta serie de estudios evidencian que tal efecto ya aparece al DP 8 con un paradigma consumatorio.

En ninguno de los experimentos llevados a cabo se encontraron efectos paradójicos consumatorios (e.g., EMREc y CNSc). En los Experimentos 5 y 7 no se halló CNSc (DP 10 y DP 14, respectivamente) y el Experimento 6 tampoco refleja la aparición del EMREc (DP 11 – 12). Sin embargo, para poder concluir que un fenómeno no se expresa es necesario realizar variaciones sistemáticas. En ese sentido, los resultados obtenidos en esta serie experimental pueden deberse a razones paramétricas de la metodología utilizada o bien a que en las edades estudiadas los animales evalúan los incentivos en función de su valor absoluto y no en relación a su valor relativo, posiblemente debido a factores madurativos. Respecto de la primera conjetura, los EPR bajo análisis pueden requerir más ensayos de entrenamiento, menor intervalo entre ensayos para fortalecer la traza de memoria del reforzador (Campbell & Spear, 1972; Rovee-Collier, 1999) o el uso de otros reforzadores. Sin embargo, la ausencia de estos fenómenos no podría deberse a una incapacidad para detectar las diferentes concentraciones de sacarosa, tal como queda evidenciado por el efecto de EMRAc en todos los experimentos expuestos.

Es interesante mencionar que en el Experimento 6 el Grupo 12-0 exhibió, durante el segundo ensayo de extinción, un porcentaje de ganancia de peso marginalmente menor que su control 2-0. Esto podría constituir un esbozo de EMREc, si bien la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos y la caída abrupta de ambos en la primera sesión de extinción impide aventurar conclusiones más firmes. Más en detalle, en el Experimento 6 los animales muestran una disminución abrupta del consumo cuando reciben agua en la primera sesión de poscambio y, en la siguiente, ambos grupos evidencian una recuperación en el consumo, con una tendencia mayor en el grupo 2-0. Este patrón de respuesta es más representativo de un CNSc que de

una extinción, dado que en esta última no suele evidenciarse una recuperación en el consumo, a menos que se presente nuevamente el reforzador. Esto podría sugerir que el agua es un incentivo menos preferido y que por lo tanto los animales podrían estar experimentando una devaluación del incentivo durante el primer día de cambio de solución, que se recupera hacia el segundo ensayo. Sin embargo, no es posible arribar a dicha conclusión dado que no está contemplado en el diseño experimental un grupo control que recibe agua en ambas fases.

Otra explicación para los resultados hallados es que en las edades estudiadas los animales respondan solo en función del valor absoluto de los reforzadores y no de acuerdo a su valor relativo (Flaherty, 1996). Esto podría deberse a que los sustratos neurales que modulan las respuestas de los EPR de los animales en edades más avanzadas, como el hipocampo y la amígdala, no alcanzaron la maduración suficiente en las edades estudiadas. De todos modos, es de destacar que estos son los primeros trabajos de EPR consumatorios, por lo cual antes de concluir ausencia del EMREc y CNSc en las edades presentadas se deben realizar variaciones en la metodología utilizada. En los experimentos que se expondrán en la siguiente sección se focalizó sobre dos de los EPR (i.e., CNSc y CPSc) variando la edad de evaluación, la cantidad de ensayos y el tipo de reforzador presentado.

Capítulo VI

Evaluación de los Efectos de CNSc y CPSc en ratas infantiles

Experimento 8. Evaluación de CNSc con un intervalo de 3 hs. entre la presentación de las soluciones (DP14-19)

Introducción. Como se indicó en el capítulo anterior, la ausencia de CNSc pudo deberse a que la edad evaluada resultó temprana para su expresión, debido posiblemente a una maduración incompleta de las áreas cerebrales implicadas (e.g., amígdala). Otra posible explicación es que las crías necesitaban de más ensayos en la fase de precambio para generar una expectativa más intensa sobre la solución al 12%. Teniendo en cuenta estos aspectos, en el Experimento 8 se evaluó el CNSc en ratas de DP 14-19 aumentando la cantidad de ensayos en ambas fases, con el doble objetivo de fortalecer la expectativa del 12% durante el precambio y facilitar el recuerdo de la solución al 12% para contrastarla con el 2% durante la fase de poscambio (Campbell & Spear, 1972; Rovee-Collier, 1999).

Por otra parte, otro de los objetivos de esta tesis fue evaluar las respuestas de reacción al sabor en una situación de devaluación del incentivo. Trabajos con ratas adultas e infantiles indican que si bien los sabores dulces y amargos provocan patrones opuestos de reacciones (hedónico vs. aversivo, respectivamente – Berridge, 2000; Grill & Norgren, 1978a), tales respuestas son plásticas y sensibles al aprendizaje. Por ejemplo, se observó que las ratas muestran respuestas de disgusto ante una solución dulce, que previamente fue asociada a un malestar gástrico (Limebeer & Parker, 2000; Parker et al., 2008; Hoffman et al., 1991; Pautassi et al., 2008; Arias et al., 2010). De acuerdo con esto, y teniendo en cuenta que la comparación y discrepancia entre aquello que se espera y lo que efectivamente se obtiene constituye una situación aversiva, es posible esperar que aun cuando se reciba un reforzador apetitivo, pero de menor magnitud al esperado, se expresen respuestas de disgusto.

Procedimiento. Se utilizaron 20 crías machos y hembras Wistar de DP 14 al comienzo del experimento, representativas de 9 camadas. El entrenamiento consistió en 2 ensayos diarios durante 4 días para la fase de

precambio (i.e., 8 ensayos en total), y 2 sesiones con 2 ensayos cada una para la fase de poscambio (i.e., 4 ensayos). El intervalo entre ensayos dentro de cada sesión fue de 3 hs. En la fase de precambio, las crías recibieron una solución azucarada al 12% (Grupo 12-2) o 2% (Grupo 2-2). Durante la fase de poscambio, el Grupo 12-2 recibió en el Ensayo 1 la solución al 12% y en el Ensayo 2 la solución al 2%. Este procedimiento se repitió al día siguiente (ensayo 2 de poscambio). El Grupo 2-2 recibió la solución al 2% durante todo el experimento. Además de utilizar como variable dependiente el porcentaje de ganancia de peso, durante la fase de poscambio se registraron las respuestas de reacción al sabor wall climbing y head shaking, ambas correspondientes al patrón aversivo. El resto del procedimiento siguió los lineamientos planteados en la metodología general.

Grupo	N	Precambio 4 días, 8 ensayos DP 14-17	Poscambio 2 días, 4 ensayos DP 18-19
12-2	10	Ensayo 1: 12% Ensayo 2: 12%	Ensayo 1: 12% Ensayo 2: 2%
2-2	10	Ensayo 1: 2% Ensayo 2: 2%	Ensayo 1: 12% Ensayo 2: 2%

Tabla 9. Esquema del diseño del experimento 8.

Resultados y discusión. La figura 13 muestra el porcentaje de ganancia de peso en función de los ensayos de las fases de precambio y poscambio. La figura sugiere que durante la fase de precambio, ambos grupos incrementan gradualmente el porcentaje de ganancia de peso a lo largo de los ensayos, siendo el Grupo Experimental quien muestra mayor consumo. El ANOVA para la fase de precambio indicó un efecto principal de Grupo, $F(1, 17) = 12,60$, $p < .002$, de Ensayo, $F(7,119) = 16.02$, $p < .0001$ y una interacción Grupo x Ensayo, $F(7,119) = 5.15$, $p < .0001$. ANOVAs independientes para cada ensayo utilizando el factor Grupo reveló una diferencia significativa del porcentaje de ganancia de peso en los ensayos 1, 3, 5 y 7 (todas $p < .05$). Esto indica que el consumo promedio de los animales que recibieron 12 % de sacarosa fue mayor que los niveles alcanzados por los que obtuvieron 2 %.

En la fase de poscambio parece observarse un efecto de contraste negativo en el Ensayo 10, reflejado por una disminución abrupta del porcentaje de ganancia de peso, que alcanza niveles por debajo del grupo control. Estas impresiones fueron confirmadas estadísticamente. El ANOVA indicó un efecto principal de Ensayo, $F(3,51) = 5.73$, $p < .001$ y una interacción Grupo x Ensayo, $F(3,51) = 6.12$, $p < .001$. ANOVAs para cada uno de los 4 ensayos de la segunda fase mostraron diferencias estadísticamente significativas en el Ensayo 9 a favor del Grupo 12-2, el cual recibió agua azucarada al 12% [$F(1,17) = 6.42$, $p < .02$], en el Ensayo 10 donde el porcentaje de ganancia de peso del Grupo 12-2 cayó por debajo del nivel del Grupo 2-2, al recibir la solución devaluada [$F(1,17) = 6.31$, $p < .02$] y en el Ensayo 11, a favor del Grupo 12-2, quien recibió nuevamente agua azucarada al 12% [$F(1,17) = 6.79$, $p < .002$]. El Ensayo 12 alcanzó una diferencia marginalmente significativa [$F(1,17) = 3.73$, $p < .07$], donde se observa que el consumo del Grupo 12-2 se encuentra por debajo del Grupo Control 2-2.

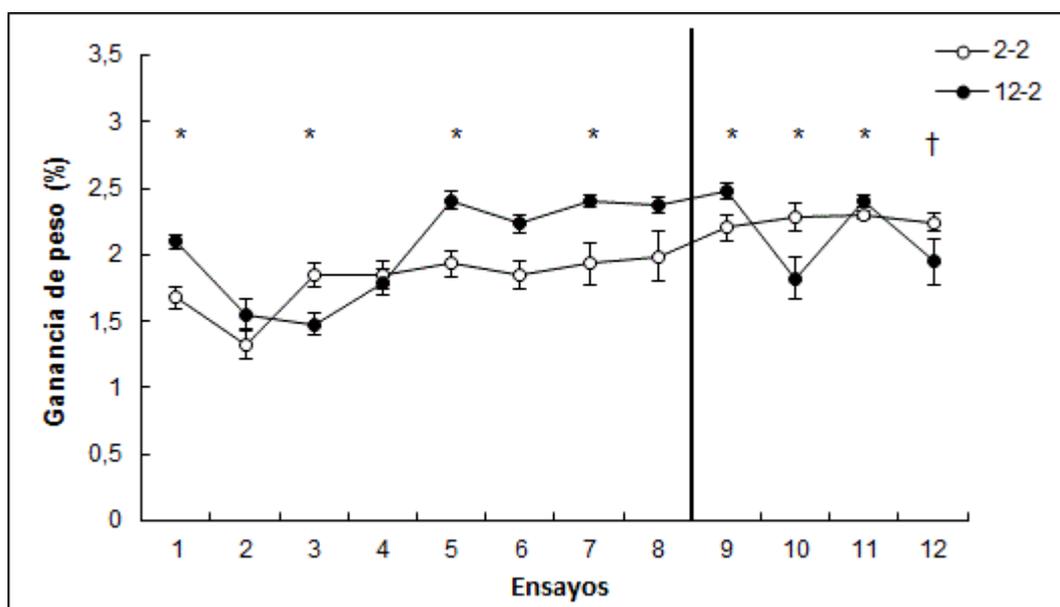


Figura 13. Porcentaje de ganancia de peso promedio (\pm ETM) del Grupo Control (puntos blancos) y Grupo Experimental (puntos negros), en función de los ensayos. La línea vertical negra entre los Ensayos 8 y 9 indica el cambio de fase entre el precambio y poscambio. * $p < .05$, † $p < .07$.

El análisis de las conductas de reacción al sabor mostró solamente un efecto principal de Grupo en la medida de head shaking, con los sujetos del

Grupo 12-2 emitiendo más head shakes que los Controles 2-2, $F(1,15) = 9.09$, $p < .009$. Comparaciones planeadas entre los Grupos devaluados y no devaluados para cada medida sobre cada ensayo del poscambio indicaron valores de frecuencia de head shaking significativamente mayor en el Grupo 12-2 que en los controles en el Ensayo 10, $F(1,18) = 9.89$, $p < .006$. Durante el segundo ensayo de devaluación (i.e., Ensayo 12) la diferencia entre los grupos fue cercana a la significación estadística, $F(1,16) = 4.09$, $p < .06$ (figura 14). Comparaciones planeadas para los puntajes de wall climbing en el Ensayo 10 hallaron una diferencia marginal en frecuencia [$F(1,18) = 3.38$, $p < .08$] y estadísticamente significativa en duración [$F(1, 18) = 5.08$, $p < .03$]. La frecuencia y duración de wall climbing fue mayor en el Grupo 12-2 que en el Grupo control (ver figuras 14 y 15, respectivamente).

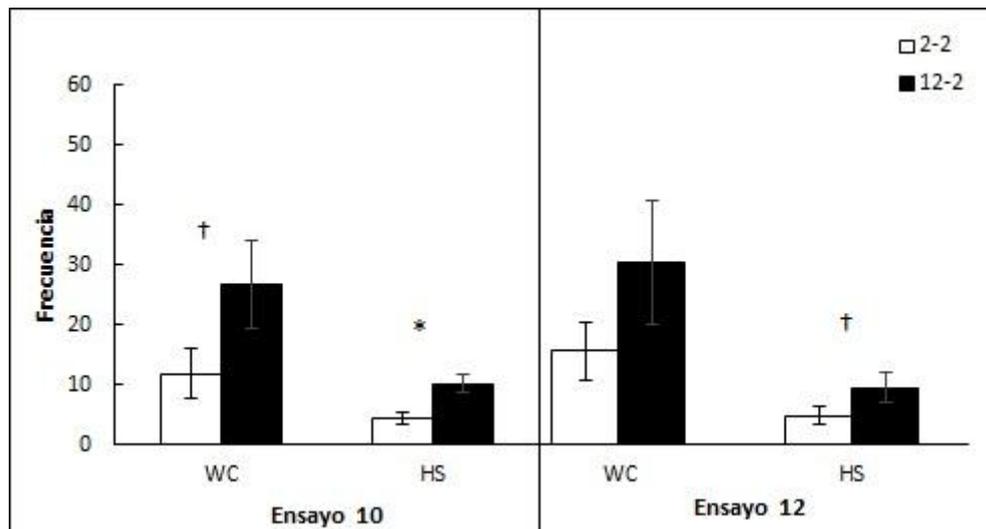


Figura 14. Frecuencias promedio (\pm ETM) de Wall Climbing (WC) y Head Shaking (HS) del Grupo Control (barras blancas) y Grupo Experimental (barras negras) durante los ensayos 10 y 12 de la fase de poscambio (cambio de solución de 12 a 2 en Grupo Experimental). * $p < .05$, † $p < .08$.

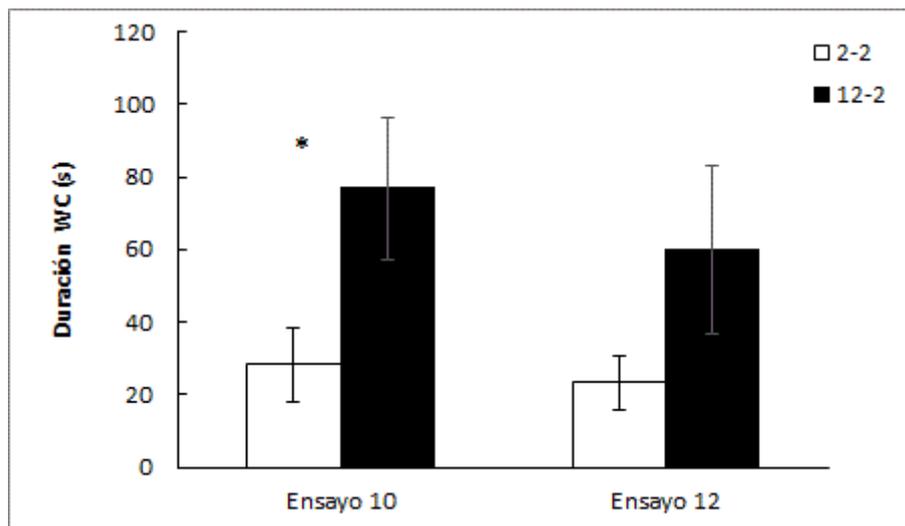


Figura 15. Duración promedio (\pm ETM) de Wall Climbing (WC) del Grupo Control (barras blancas) y Grupo Experimental (barras negras) durante los ensayos 10 y 12 de la fase de poscambio (i.e., cambio de solución de 12 a 2 en el Grupo Experimental). * $p < .05$.

Los resultados indican la expresión de CNSc en ratas al DP 18, lo cual sugiere que a dicha edad los animales moldean sus respuestas de consumo en función de las expectativas sobre los reforzadores recibidos. Asimismo, la disminución del consumo en las ratas que reciben la devaluación está asociada a un aumento de las respuestas de disgusto como head shaking y wall climbing, ya que las diferencias entre los grupos ocurrieron solamente durante el primer ensayo de devaluación del reforzador. No obstante, teniendo en cuenta que el cambio de solución de 12% a 2% ocurre en el mismo día, los resultados podrían explicarse por un efecto de carry-over sensorial. En otras palabras, que en la expresión del efecto de contraste hallado exista un componente de procesamiento periférico del sistema nervioso (Weinstock, 1954, 1958).

Experimento 9. Evaluación del CNSc con un intervalo de 24 hs. entre fases

Introducción. En el experimento anterior se halló CNSc proporcionando a las crías las soluciones de mayor (12%) y menor magnitud (2%) dentro de la misma sesión, con un intervalo entre ensayos de 3 hs. No obstante, una explicación alternativa a esta disminución en el consumo de sacarosa es que podría deberse a una mera persistencia del sabor percibido previamente (i.e.,

12% de sacarosa – Weinstock, 1954, 1958). Aunque un intervalo de 3 hs. parece lo suficientemente extenso para descartar esta explicación de tipo sensorial, se llevó a cabo el siguiente experimento para desestimar tal alternativa y asegurar que el efecto observado surge de procesos originados a nivel de sistema nervioso central. El Experimento 9 tuvo como objetivo replicar el CNSc en ratas de DP 14 a 19 pero recibiendo la fase de poscambio 24 hs. después de finalizado el último ensayo de precambio.

Procedimiento. Se utilizaron 32 ratas hembras Wistar de DP 14 al comienzo del experimento, representativas de 8 camadas. El diseño experimental fue el mismo que en el Experimento 8 con la única excepción que durante los 4 ensayos de la fase de poscambio todos los animales recibieron la solución al 2%. Durante la fase de poscambio también se registraron las respuestas de wall climbing, head shaking y chin rubb. Se evaluó a los animales en cajas espejadas de forma trapezoide para poder obtener un registro más detallado de las respuestas. Las características de estas cajas permiten observar las respuestas que realizan los animales aun cuando se encuentran de espaldas a la filmadora. El resto del procedimiento siguió los lineamientos planteados en la metodología general.

Grupo	N	Precambio	Poscambio
		4 días, 8 ensayos DP 14-17	2 días, 4 ensayo DP 18-19
12-2	14	12%	2%
2-2	16	2%	2%

Tabla 10. Esquema del diseño del Experimento 9

Resultados y discusión. En la figura 16 se muestra el porcentaje de ganancia de peso en función de los ensayos de las fases de precambio y poscambio. En la primera fase se halló un efecto principal de Ensayo, $F(7,196) = 15.84$, $p < .0001$ y un efecto de interacción Grupo x Ensayo, $F(7,196) = 2.96$, $p < .005$. Un ANOVA para cada ensayo mostró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos 12-2 y 2-2 en los Ensayos 1 y 8 (todos los $p <$

.05.). En ambos ensayos el Grupo 12-2 mostró mayor porcentaje de ganancia de peso que el Grupo 2-2.

En la fase de poscambio se observa en el ensayo 9 una disminución abrupta del porcentaje de ganancia de peso del Grupo 12-2, respecto del Grupo 2-2, que sugiere la expresión de un efecto de CNSc. Un ANOVA de medidas repetidas de los 4 ensayos de esta fase arrojó un efecto marginalmente significativo del Factor Ensayo, $F(1, 28) = 3.41, p < .07$. Comparaciones planeadas revelaron que el Grupo 12-2 evidenció un porcentaje de ganancia de peso significativamente menor que los controles 2-2, durante el primer ensayo de poscambio, $F(1, 29) = 5.54, p < .026$. En el resto de los ensayos no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p > .05$).

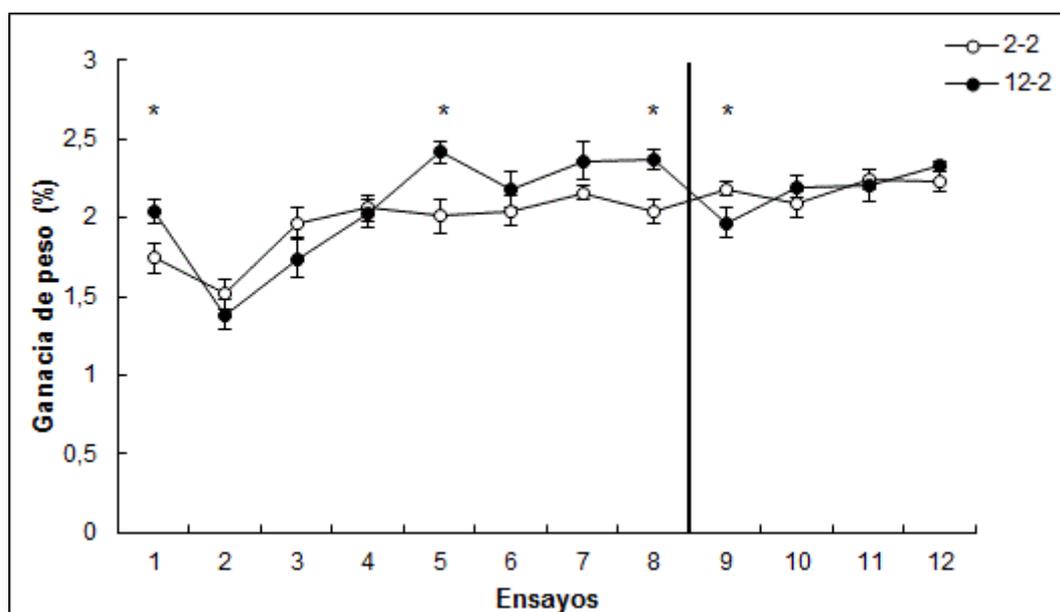


Figura 16. Porcentaje de ganancia de peso promedio (\pm ETM) del Grupo 2-2 (puntos blancos) y Grupo 12-2 (puntos negros), en función de los ensayos. La línea vertical negra entre los Ensayos 8 y 9 indica el cambio de fase entre el precambio y poscambio. * $p < .05$.

El análisis de la frecuencia y duración de wall climbing reveló un efecto de Ensayo, $F(1, 27) = 33.58, p < .0001$ y $F(1, 27) = 16.65, p < .0001$, respectivamente (figuras 17 y 18). El ANOVA para la conducta head shaking halló un efecto significativo de Grupo, $F(1, 26) = 5.92, p < .02$. La interacción Grupo x Ensayo no fue significativa. Comparaciones planeadas indicaron que

el Grupo 12-2 emitió mayor cantidad de head shaking en relación al Control 2-2, en el Ensayo 9 [$F(1, 27) = 6.11, p < .02$]. Respecto del chin rub, se halló un efecto de Ensayo [$F(1, 26) = 8.98, p < .006$], Grupo [$F(1, 26) = 9.57, p < .005$] y la interacción Ensayo x Grupo [$F(1, 26) = 7.50, p < .011$]. Un ANOVA de un factor mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en el Ensayo 9, $F(1, 27) = 9.26, p < .005$, indicando que el grupo 12-2 emitió más respuestas de chin rubbing tras experimentar la devaluación del reforzador (figura 17).

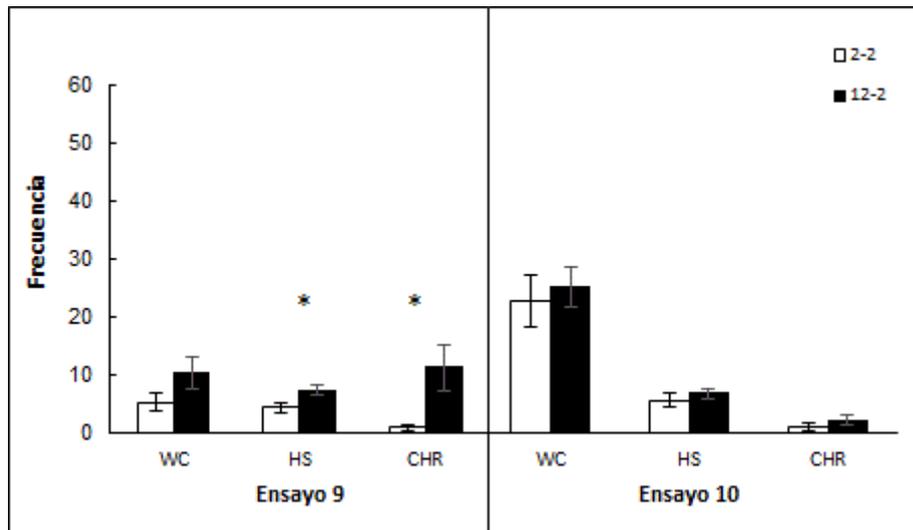


Figura 17. Frecuencias promedio (\pm ETM) de Wall Climbing (WC), Head Shaking (HS) y Chin Rubbing (CHR) del Grupo Control (barras blancas) y Grupo Experimental (barras negras) durante los ensayos 9 y 10 de la fase de poscambio. * $p < .05$.

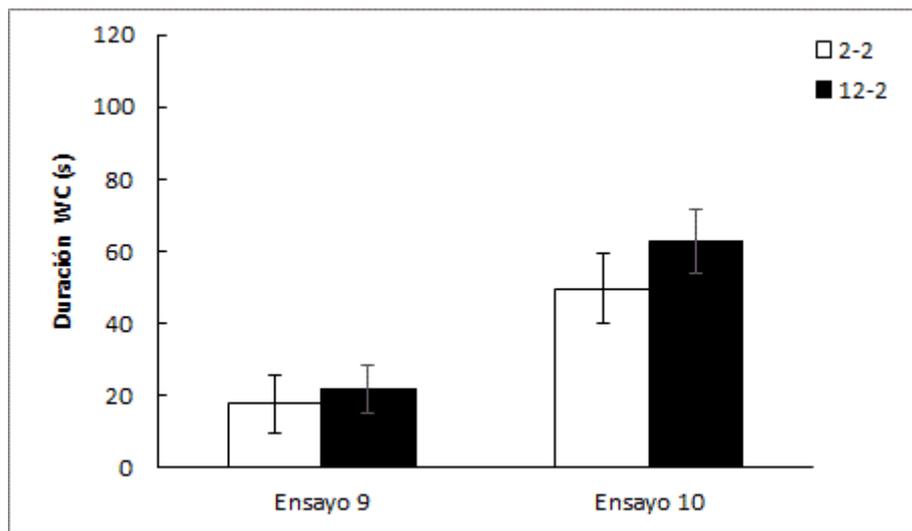


Figura 18. Duración promedio (\pm ETM) de Wall Climbing (WC) del Grupo Control (barras blancas) y Grupo Experimental (barras negras) durante los ensayos 9 y 10 de la fase de poscambio.

Los resultados reflejan que los animales son capaces de responder en función de la concentración de la solución recibida (fase de precambio) y que al DP 18 se observa un potencial efecto de CNSc en el primer ensayo de la fase de poscambio, el cual desapareció en los ensayos siguientes. Dado que el efecto se expresó a las 24 hs. del último ensayo de precambio, esto minimiza la intervención de procesos sensoriales, aunque no se puede desestimar completamente la intervención de efectos de carry-over intrasesión en su expresión (Weinstock, 1954, 1958). Los resultados de las conductas sugieren que la devaluación del reforzador al DP18 produce un estado afectivo aversivo, y que la duración de estas respuestas coincide con la disminución abrupta del consumo (expresado por el porcentaje de ganancia de peso corporal). En resumen, el efecto de CNSc se produce exclusivamente en el primer ensayo de la fase de poscambio de solución, y este fenómeno se vió reflejado tanto por el porcentaje de ganancia de peso como por las respuestas de reacción al sabor.

Experimento 10. Delimitación de la edad de emergencia del CNSc

Introducción. Este experimento tuvo como objetivo determinar la edad de emergencia del CNSc. Para ello se evaluó dos rangos de edad: DP 13 a 18 (la fase de poscambio de solución ocurrió en el DP 17 y 18) y DP 10 a 15 (fase

de poscambio, DP 14-15). Asimismo, durante la fase de poscambio se registraron las mismas respuestas de disgusto que en el experimento anterior.

Procedimiento. Se utilizaron 64 ratas machos y hembras Wistar. La mitad de los animales comenzó el experimento al DP 13 y la otra mitad a DP10. El diseño y procedimiento fue el mismo que en el Experimento 9.

Edad	Grupo	N	Precambio 4 días, 8 ensayos	Poscambio 2 días, 4 ensayos
DP 13-18	12-2	16	12%	2%
	2-2	16	2%	2%
DP 10-15	12-2	16	12%	2%
	2-2	16	2%	2%

Tabla 11. Esquema del diseño del Experimento 10.

Resultados y discusión. En las figuras 19 (DP 10-15) y 20 (DP 13-18) se observa que durante la fase de precambio las crías de ambas edades incrementaron el porcentaje de ganancia de peso a lo largo de los ensayos, estando en ambos casos el Grupo 12-2 por encima del Grupo 2-2.

Durante la fase de precambio al DP 10-15 se halló un efecto principal de Grupo, $F(1, 30) = 11.31, p < .002$, Ensayo, $F(7, 210) = 29.006, p < .0001$, y la interacción de Ensayo por Grupo, $F(7, 210) = 5.39, p < .00001$. ANOVAs independientes para cada sesión utilizando el factor Grupo indicó un porcentaje de ganancia de peso significativamente mayor en los animales que recibieron la solución al 12% que aquellos que recibieron 2% de sacarosa en los ensayos 5, 6, 7 y 8 (todos los $p < 0.05$). De modo similar, en las crías de DP 13 a 18 el Grupo 12-2 mostró un mayor porcentaje de ganancia de peso que el Grupo 2-2. Se halló un efecto principal del Factor Grupo, $F(1, 30) = 7.64, p < .009$ y Ensayo, $F(7, 210) = 16.74, p < .0001$.

Durante la fase de poscambio, en los animales de DP 10-15 no se hallaron efectos principales ni la interacción entre los factores analizados ($p > .05$). Comparaciones planeadas mostraron que el Grupo 12-2 disminuyó progresivamente el consumo mostrando aún un mayor porcentaje de ganancia

de peso respecto del grupo control en el Ensayo 9, $F(1, 31) = 4.86$, $p < .03$, y homologando el mismo con los animales del Grupo 2-2 a partir del Ensayo 10.

Durante la fase de poscambio las crías de DP 13 a 18 mostraron un comportamiento similar a las más pequeñas (i.e., mostraron un ajuste del consumo hacia la solución devaluada). Se halló un efecto principal de Ensayo, $F(3, 90) = 5.47$, $p < .002$. No se encontró un efecto principal de Grupo ni la interacción entre ambos factores ($p > .05$). Las comparaciones planeadas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ninguno de los ensayos de poscambio.

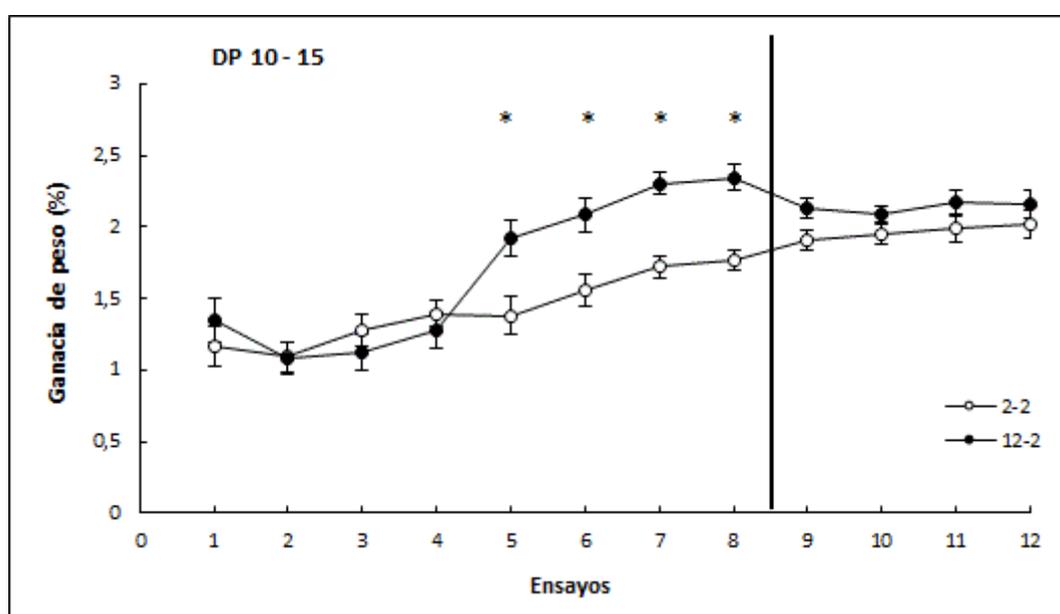


Figura 19. Porcentaje de ganancia de peso promedio (\pm ETM) del Grupo Control (puntos blancos) y Grupo Experimental (puntos negros) al DP 10 a 15, en función de los ensayos. La línea vertical negra entre los ensayos 8 y 9 indica el cambio de fase entre el precambio y poscambio. * $p < .05$.

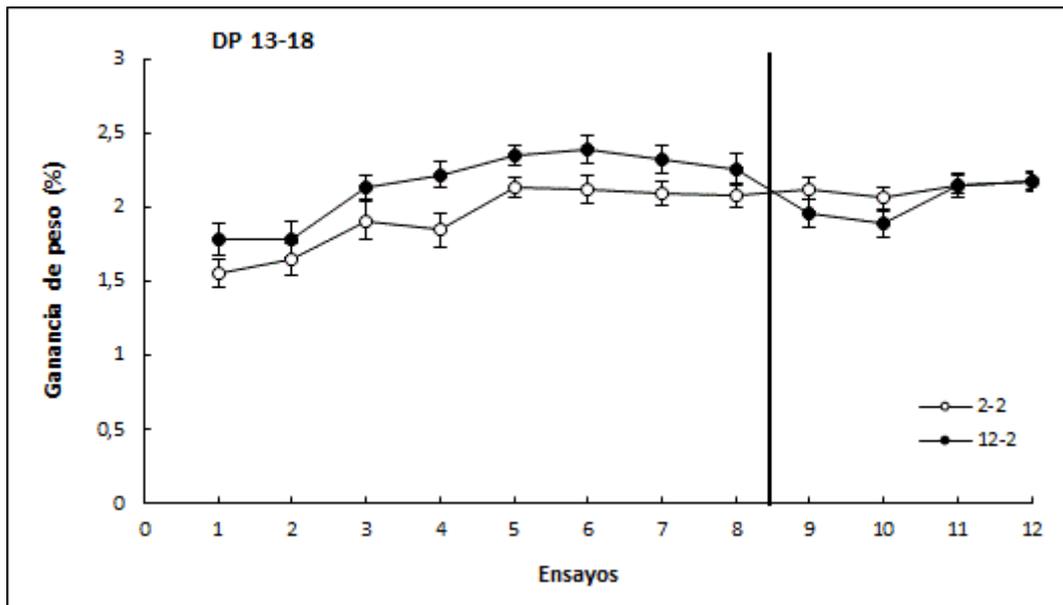
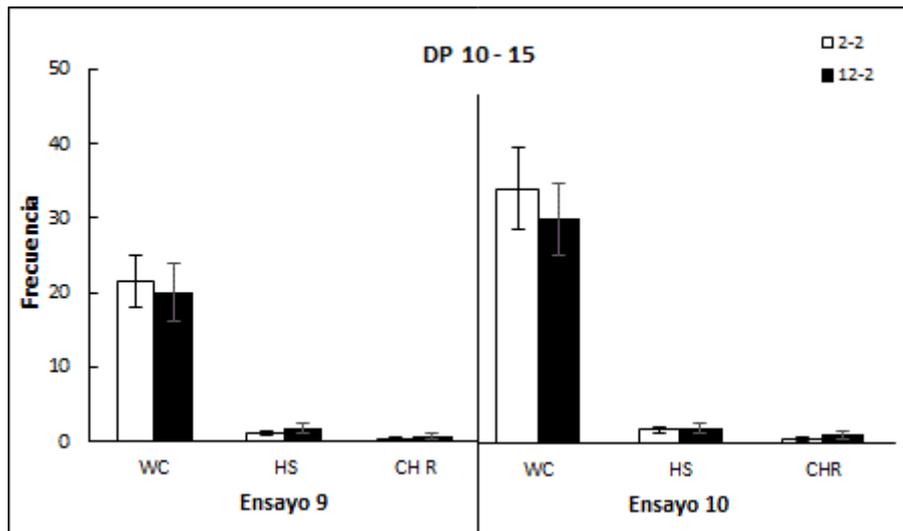


Figura 20. Porcentaje de ganancia de peso promedio (\pm ETM) del Grupo Control (puntos blancos) y Grupo Experimental (puntos negros) al DP 13 a 18, en función de los ensayos. La línea vertical negra entre los ensayos 8 y 9 indica el cambio de fase entre el precambio y poscambio.

Los resultados de las conductas mostraron que en los animales de DP 10 a 15 hubo un efecto de Ensayo en la conducta de wall climbing, $F(1, 30) = 17.14$, $p < .0001$. Durante el ensayo 10 ambos grupos mostraron mayores conductas de wall climbing que en el ensayo 9. Los análisis de comparaciones planeadas no alcanzaron la significación estadística en ninguna de las conductas, en ninguno de los ensayos (figuras 21 y 22). Respecto a los animales de DP 13 a 18, se halló para la conducta de wall climbing un efecto principal del Factor Ensayo, $F(1, 30) = 6.72$, $p < .015$ y para la conducta de chin rub un efecto principal de Ensayo, $F(1, 30) = 8.50$, $p < .007$, Grupo, $F(1, 30) = 5.83$, $p < .02$ y marginal para la interacción de ambos factores, $F(1, 30) = 3.57$, $p < .07$. Las comparaciones planeadas mostraron que el Grupo 12-2 realizó mayor frecuencia de la conducta de chin rubb en el Ensayo 9, $F(1, 31) = 5.11$, $p < .03$ (ver figura 23).



Figuras 21. Frecuencias promedio (\pm ETM) de Wall Climbing (WC), Head Shaking (HS) y Chin Rubbing (CHR) del Grupo Control (barras blancas) y Grupo Experimental (barras negras) durante los ensayos 9 y 10 de la fase de poscambio, en ratas de DP 10-15.

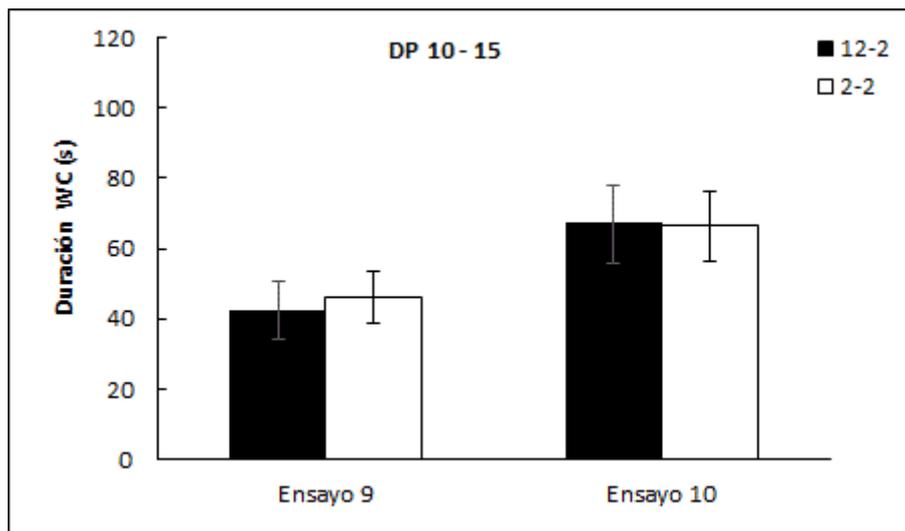


Figura 22. Duración promedio (\pm ETM) de Wall Climbing (WC) del Grupos Control (barras blancas) y Grupo Experimental (barras negras) durante los ensayos 9 y 10 de la fase de poscambio, en ratas de DP 10-15.

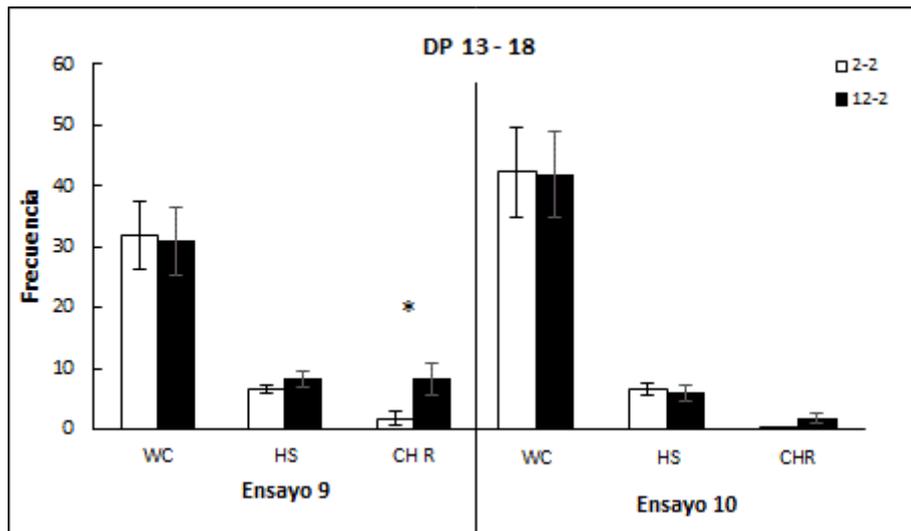


Figura 23. Frecuencias promedio (\pm ETM) de Wall Climbing (WC), Head Shaking (HS) y Chin Rubbing (CHR) del Grupo Control (barras blancas) y Grupo Experimental (barras negras) durante los ensayos 9 y 10 de la fase de poscambio, en ratas de DP 13-18. * $p < .05$.

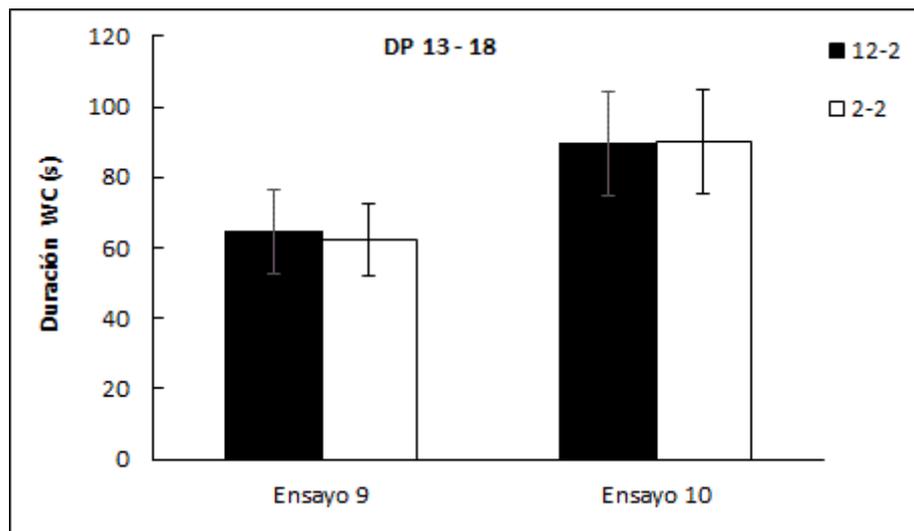


Figura 24. Duración promedio (\pm ETM) de Wall Climbing (WC) del Grupos Control (barras blancas) y Grupo Experimental (barras negras) durante los ensayos 9 y 10 de la fase de poscambio, en ratas de DP 13-18.

Los resultados muestran que al DP 14 y DP 17, al ser expuestas a la solución devaluada, las crías ajustan su consumo hacia los niveles del grupo control. Estos resultados muestran los límites del fenómeno estudiado en el desarrollo de la rata. Respecto de las conductas, resulta llamativo que los animales del grupo experimental de DP 17 mostraron mayor frecuencia de chin rubbing, lo cual no fue acompañado por una disminución en la medida de ganancia de peso. Esto podría sugerir que al DP 17 un cambio abrupto y

sorpresivo en la calidad de un reforzador presentado provoque una alteración afectiva, reflejada en una conducta de reacción al sabor, sin que esto se evidencie en una alteración consumatoria. Otra explicación posible es que existan diferencias en cuanto a la sensibilidad de las medidas para detectar cambios comportamentales, sugiriendo que el TRS podría resultar más propicio para detectar cambios afectivos respecto a la valoración de los reforzadores en edades como las aquí evaluadas (figura 23). Un ejemplo de esto se encuentra en Stanton y cols. (1984), quienes encuentran CNsim a los DP 14-17 midiendo la latencia de agarre al pezón de la madre, pero no con la medida tradicional de velocidad de recorrido de un corredor recto.

Experimento 11. Presentaciones de soluciones de Sacarosa y Quinina

Introducción. Los resultados hallados en los experimentos anteriores nos advierten sobre el rol que podrían tener las expectativas sobre la valoración hedónica de los reforzadores. Las crías que experimentaron la devaluación del incentivo no solo mostraron una supresión activa del consumo, sino que exhibieron respuestas de disgusto (e.g., wall climbing, head shaking, chin rubbing) ante una solución apetitiva devaluada, sugiriendo que esta experiencia impacta sobre la evaluación hedónica que se realiza sobre un reforzador. En este contexto, uno podría preguntarse si el hecho de experimentar previamente un sabor afecta la palatabilidad de otro diferente. En otras palabras, ¿ante la expectativa de recibir una solución amarga se valora como más apetitiva una solución dulce? Y, por el contrario, ¿ante la expectativa de recibir una solución dulce, es valorada como más negativa una solución con sabor amargo? El contar con el registro de un amplio repertorio de respuestas de reacción al sabor es un paso necesario en dicha dirección. Sin embargo, la literatura con ratas pre-destetadas abarca algunos aspectos de las respuestas de reacción al sabor (Hal & Bryan, 1981; Hoffman et al., 1991). Por esta razón, el objetivo de este experimento fue (a) evaluar un amplio repertorio de respuestas de gusto y disgusto ante soluciones de sacarosa y quinina en ratas de DP 17 y 18, y (b) examinar si el patrón de respuestas de reacción al sabor se modifica en función del sabor de la solución recibida previamente.

Procedimiento. Se utilizaron 28 ratas hembras Wistar, representativas de 10 camadas, de DP 17 al comienzo del entrenamiento. El entrenamiento consistió en 4 ensayos, 2 por día, con un intervalo de 3 hs. El diseño fue intrasujeto donde cada sujeto recibió una solución de sacarosa al 2% y otra de quinina al 0.1%. La secuencia de administración en los ensayos 1 a 4 fue *sacarosa-quinina-quinina-sacarosa* para 13 animales y *quinina-sacarosa-sacarosa-quinina* para los 15 restantes. Además del porcentaje de ganancia de peso se registraron las siguientes conductas de reacción al sabor: duración de mouthing y paw lick, frecuencia de chin rubbing, head shake y flailing of the forelimbs, frecuencia y duración de face washing, wall climbing y paw tread. En todo el entrenamiento se utilizaron cajas espejadas.

El resto del procedimiento siguió los lineamientos de la metodología general.

N	Sesión 1		Sesión 2	
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4
13	Sacarosa	Quinina	Quinina	Sacarosa
15	Quinina	Sacarosa	Sacarosa	Quinina

Tabla 12. Esquema del diseño del Experimento 11.

Resultados y discusión. La figura 25 muestra el porcentaje de ganancia de peso en cada uno de los ensayos en los que se infundió sacarosa (barras izquierdas) y quinina (barras derechas). Para analizar si el orden de exposición en el que se experimentaron los sabores afectó los patrones de ingesta, se llevó a cabo un ANOVA de medidas repetidas para cada sabor. El factor intersujetos fue el Orden en que se proporcionó el sabor y el factor intrasujeto los Ensayos. El objetivo de este análisis fue evaluar si la ingesta de sacarosa cambiaba en función de si se experimentó antes o después de la quinina y, viceversa, si el consumo de quinina variaba dependiendo de si se experimentaba antes o después de la solución de sacarosa. El ANOVA correspondiente a la solución azucarada arrojó un efecto principal de Ensayo [$F(1, 26) = 4.98, p < .035$] y una interacción Orden x Ensayo [$F(1, 26) = 6.05, p <$

.021]. El análisis pos hoc indicó que los animales que experimentaron sacarosa luego de recibir dos ensayos consecutivos de quinina aumentaron significativamente su porcentaje de ganancia de peso, en comparación a cuando la recibieron por primera vez [$p < .004$].

En cuanto a la quinina, el ANOVA arrojó un efecto principal de Ensayo [$F(1, 27) = 4.89, p < .036$] y una interacción Orden x Ensayo [$F(1, 27) = 12.31, p < .002$]. Las comparaciones de pares indicaron que el consumo de quinina disminuyó significativamente luego de recibir uno [$p < .04$] o dos ensayos consecutivos de sacarosa [$p < .0003$], en comparación a cuando la recibieron por primera vez.

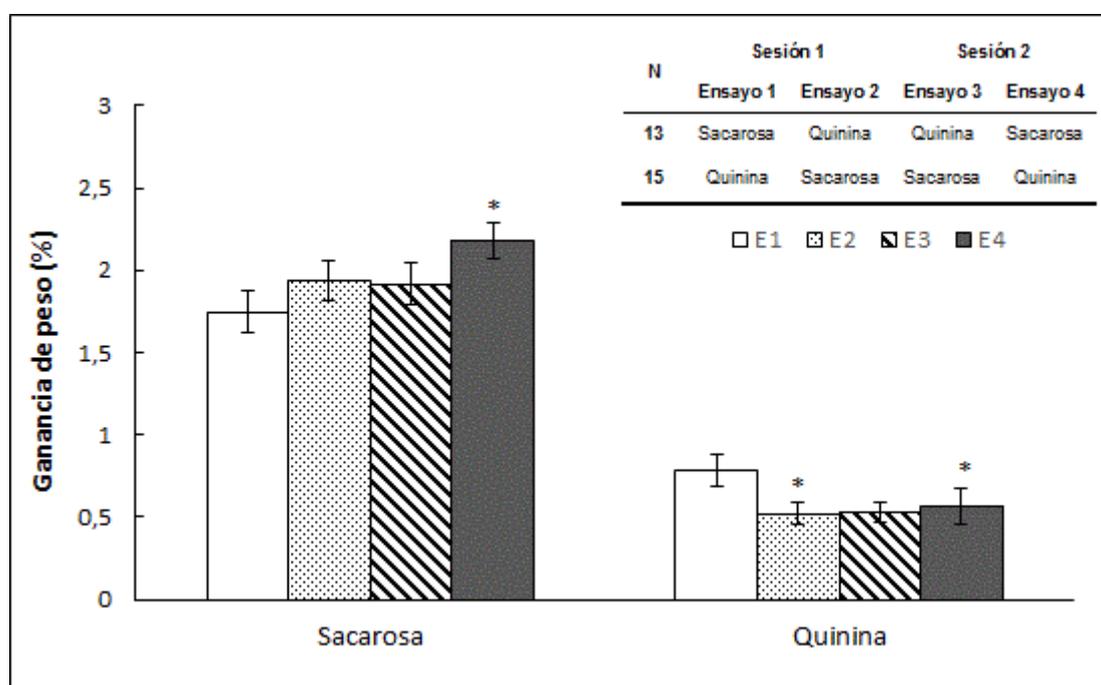


Figura 25. Porcentaje de ganancia de peso promedio (\pm ETM) para los ensayos 1 a 4 en los que se infundió sacarosa (Izq) o quinina (Der). Para cada sabor, los ensayos 1 y 4 se corresponden con una secuencia y los ensayos 2 y 3 se corresponden con la secuencia contraria. (*) Indica $p < .05$ en comparación con el Ensayo 1.

ANOVAs similares se corrieron para las respuestas de reacción al sabor. La figura 26 muestra las frecuencias de chin rubbing, head shaking, face washing, paw treading y flailing of forelimbs en cada uno de los ensayos en los que se infundió sacarosa (barras izquierdas) y quinina (barras derechas). Siguiendo la misma lógica, en la figura 27 se muestra la duración de mouthing, paw lick, face washing, wall climbing y paw tread para ambos sabores. Cuando

se compararon las respuestas del patrón apetitivo en función del orden en que se recibió la solución de sacarosa, se halló un efecto principal de sesión para paw lick [$F(1, 26) = 7.48, p < .011$] y una interacción Orden x Ensayo para mouthing [$F(1, 26) = 20.98, p < .0001$]. Los análisis pos hoc indicaron que las crías realizan más mouthing luego de recibir uno [$p < .04$] o dos ensayos consecutivos de quinina [$p < .001$], en relación a cuando la experimentan por primera vez. Asimismo, esta respuesta se expresó con más fuerza cuando la sacarosa fue precedida por dos ensayos consecutivos de quinina, en comparación a cuando fue precedida por un ensayo de quinina seguido por otro de sacarosa [$p < .03$]. Cuando los animales recibieron por segunda vez consecutiva sacarosa disminuyeron el mouthing [$p < .01$], en relación al ensayo previo con este mismo sabor.

El ANOVA correspondiente al patrón aversivo arrojó un efecto principal de Ensayo para las frecuencias de face wash [$F(1, 26) = 11.10, p < .003$], wall climb [$F(1, 26) = 8.13, p < .008$], paw tread [$F(1, 26) = 36.66, p < .00001$] y flail of forelimbs [$F(1, 26) = 29.76, p < .00001$]; un efecto de Orden para chin rubbing [$F(1, 26) = 4.39, p < .046$], head shake [$F(1, 26) = 5.41, p < .028$] y frecuencia de wall climb [$F(1, 26) = 4.27, p < .049$]; y la interacción Ensayo x Orden para chin rubbing [$F(1, 26) = 12.49, p < .002$] y frecuencia y duración de paw tread [$F(1, 26) = 9.36, p < .005$ y $F(1, 26) = 5.96, p < .022$, respectivamente]. Comparaciones pos hoc indican que los animales redujeron significativamente la emisión de chin rubbing luego de experimentar uno [$p < .0003$] o dos ensayos consecutivos de quinina [$p < .01$], en comparación a cuando reciben la sacarosa por primera vez. Asimismo, muestran un incremento en esta conducta cuando reciben sacarosa por segunda vez consecutiva en comparación a cuando reciben sacarosa precedida de quinina [$p < .03$]. La frecuencia y duración de paw tread fue menor cuando la solución de sacarosa fue precedida por dos ensayos consecutivos de quinina, en comparación a cuando fue precedida por un ensayo de quinina seguido por otro de sacarosa [$p < .02$ y $p < .004$, respectivamente]. De forma similar a la respuesta de chin rubbing, la frecuencia y duración de paw tread fue mayor cuando los animales reciben sacarosa por segunda vez consecutiva en comparación a cuando reciben sacarosa precedida de quinina [$p < .00001$ y $p < .00001$].

.021, respectivamente]. Por último, las crías expresaron mayor frecuencia de paw tread al recibir sacarosa por segunda vez consecutiva en comparación a cuando la reciben por primera vez [$p < .00001$] y significativamente más cuando obtienen la solución azucarada luego de un ensayo con quinina que cuando la reciben luego de dos ensayos consecutivos con la solución amarga [$p < .002$].

En cuanto a la solución de quinina, el ANOVA correspondiente a las respuestas apetitivas arrojó una interacción significativa Ensayo x Orden para mouthing [$F(1, 26) = 5.98, p < .022$]. Los análisis pos hoc indicaron que, cuando la solución amarga se proporcionó luego de dos ensayos consecutivos de sacarosa, el mouthing se redujo significativamente en comparación a cuando se recibió por primera vez [$p < .005$], luego de un ensayo de sacarosa [$p < .026$] o después de recibir primero sacarosa y luego quinina [$p < .013$]. El ANOVA de las respuestas de disgusto indicó un efecto principal de Ensayo para duración de wall climbing [$F(1, 26) = 6.06, p < .021$] y frecuencia de paw tread [$F(1, 26) = 6.18, p < .02$] y flail of forelimb [$F(1, 26) = 7.03, p < .014$], un efecto de Orden para frecuencia y duración de wall climbing [$F(1, 26) = 5.15, p < .032$ y $F(1, 26) = 5.95, p < .022$, respectivamente] y una interacción Ensayo x Orden para esta última respuesta, tanto en frecuencia [$F(1, 26) = 11.75, p < .002$] como en duración [$F(1, 26) = 18.04, p < .0003$]. Las comparaciones pos hoc indicaron que cuando los animales recibieron la solución amarga luego de dos ensayos consecutivos de la sacarosa, el wall climbing se expresó con mayor frecuencia y duración en relación a cuando las crías la recibieron por primera vez [$p < .01$ y $p < .00005$], luego de un ensayo de sacarosa [$p < .038$ y $p < .002$] o después de recibir primero quinina y luego sacarosa [$p < .0007$ y $p < .00007$].

Los datos sugieren que el orden de administración de las soluciones afecta la expresión de algunas, aunque no todas, las respuestas de reacción al sabor. En la tabla 13 se puede observar un resumen de los resultados obtenidos por los ANOVAs.

N	Sesión 1		Sesión 2	
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4
13	Sacarosa	Quinina	Quinina	Sacarosa
15	Quinina	Sacarosa	Sacarosa	Quinina

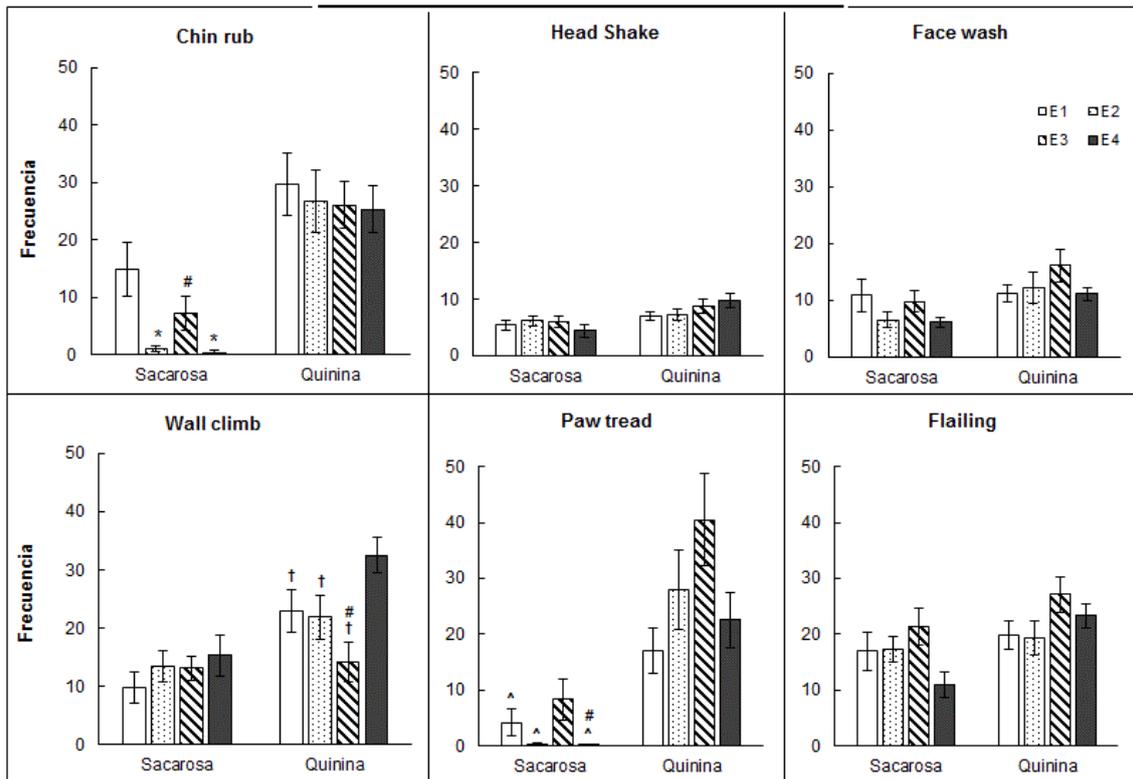


Figura 26. Frecuencia de chin rubbing, head shaking, face washing, wall climbing, paw treading y flailing of forelimbs, para los ensayos 1 a 4 en los que se infundió sacarosa (Izq) o quinina (Der). (*) indica comparación con el Ensayo 1, (#) indica comparación con el Ensayo 2, (^) indica comparación con el Ensayo 3, (†) indica comparación con el Ensayo 4. Para todos los símbolos $p < .05$.

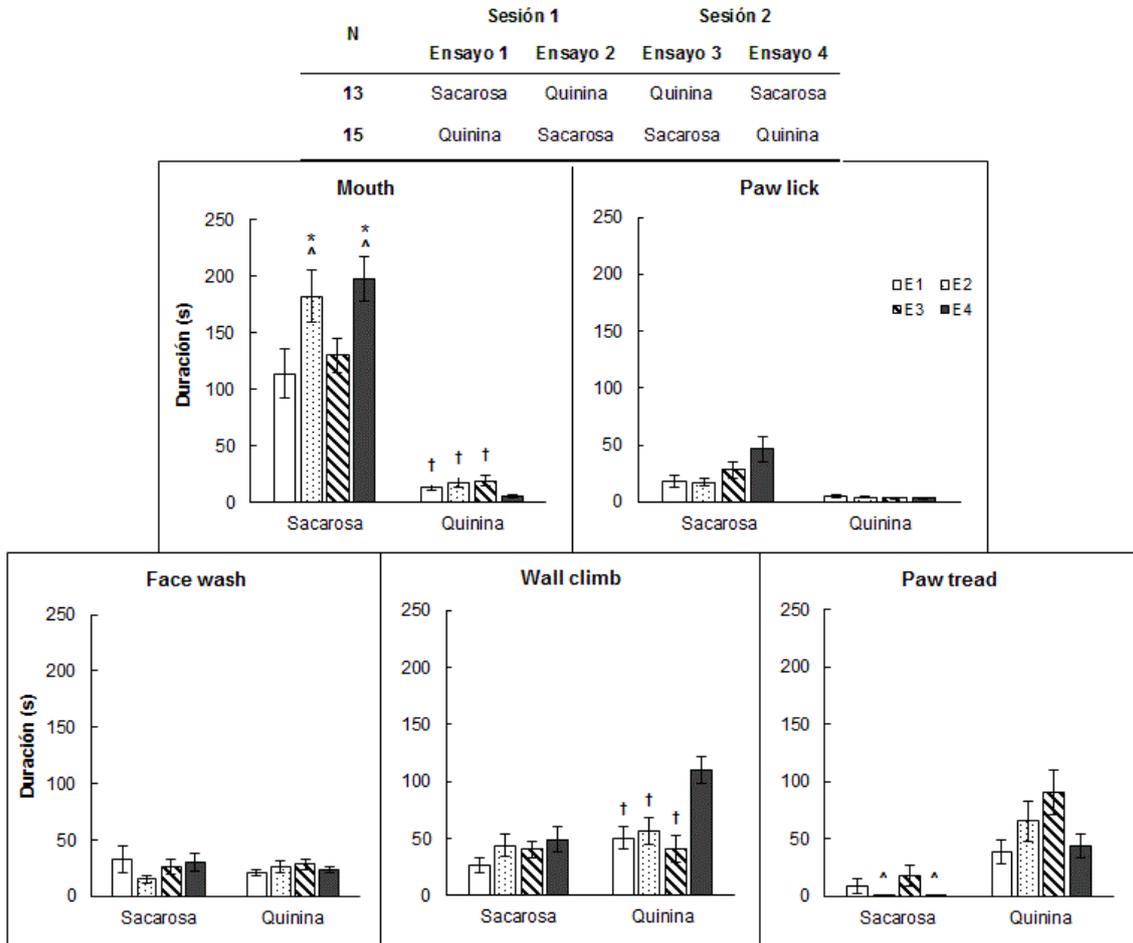


Figura 27. Duración de mouthing, paw lick, face washing, wall climbing y paw tread para los ensayos 1 a 4 en los que se infundió sacarosa (Izq) o quinina (Der). (*) indica comparación con el Ensayo 1, (#) indica comparación con el Ensayo 2, (^) indica comparación con el Ensayo 3, (†) indica comparación con el Ensayo 4. Para todos los símbolos $p < .05$.

ANOVA		Sacarosa			Quinina			
		Orden	Sesión	Orden x Sesión	Orden	Sesión	Orden x Sesión	
Consumo	%BWG	-	.034	.021	-	.037	.002	
Patrón Hedónico	Mouthing	-	-	.0001	-	-	.022	
	Paw Licking	-	.011	-	-	-	-	
Patrón Aversivo	Chin rubbing	.046	-	.002	-	-	-	
	Head Shaking	.028	-	-	-	-	-	
	Face Washing		-	.003	-	-	-	-
			-	-	-	-	-	-
	Wall Climbing	.049	.008	-	.032	-	.002	
	Paw Treading		-	-	-	.022	.021	.0001
			-	.0001	.005	.085	.02	-
Flailing of forelimbs	-	-	.022	.063	-	-		
		-	.0001	-	-	.013	-	

Tabla 13. Resumen de los resultados obtenidos en el ANOVA. Para las respuestas de face whashing, wall climbing y paw treading se muestra los resultados de frecuencia (fila superior) y duración (fila inferior).

Experimento 12. Efecto de CPSc ante la devaluación de una solución con sabor amargo

Introducción. En los experimentos expuestos hasta aquí se encontró que el efecto de contraste negativo puede observarse ya sea por devaluación en la concentración de una solución dulce (i.e., 12% a 2% – Experimentos 8 y 9) o el cambio sorpresivo de un sabor (i.e., dulce a amargo – Experimento 11). En ambos casos, la violación de la expectativa de recibir un reforzador apetitivo de mayor magnitud en un contexto determinado, indujo respuestas de frustración tales como disminución en el consumo, aumento de las reacciones aversivas y disminución de las respuestas del patrón apetitivo hacia el sabor. Por otro lado, en el Experimento 11 se halló también un aumento de las respuestas del patrón hedónico (i.e., mouthing) y disminución de respuestas aversivas (i.e., chin rubbing y paw tread) en los animales que recibieron una

solución dulce ante la expectativa de recibir una solución con sabor amargo. Esto podría ser indicativo de respuestas de euforia.

Sin embargo, ¿sucederá de forma similar cuando se comparan situaciones aversivas de diferente intensidad? En otras palabras, ¿es posible observar un efecto de contraste positivo al experimentar una situación menos aversiva cuando en el mismo contexto se experimentó una altamente aversiva? Como se describió en el capítulo III, si bien el CPSc es un fenómeno elusivo cuando se evalúa con soluciones apetitivas, se evidenció de forma contundente al utilizar estímulos aversivos (i.e., descargas eléctricas moderadas) en un paradigma de evitación activa (Cándido et. al., 2002; Maldonado et. al., 2007). No obstante, hasta el momento no se halló en la literatura reportes de CPSc utilizando soluciones aversivas. El objetivo de este experimento fue evaluar si el CPSc ocurre al pasar de una solución altamente aversiva (0.1 % de quinina) a otra de menor aversividad (0.01 % de quinina).

Procedimiento. Se utilizaron 19 ratas machos y hembras Wistar, de DP 14 al comienzo del experimento. El entrenamiento consistió en una fase de precambio con 4 ensayos (uno por día - DP 14 a 17), en la cual los animales recibieron una solución de quinina al 0.1% (Grupo 0.1 – 0.01) o 0.01% (Grupo 0.01 – 0.01). La fase de poscambio tuvo una duración de 2 ensayos (uno por día - DP 18 y 19) en la que a ambos grupos se les proporcionó 0.01% de quinina. Se registraron las siguientes respuestas de reacción al sabor paw lick (conducta del patrón apetitivo), head shake, chin rub y paw tread (respuestas de disgusto). El resto del procedimiento siguió los lineamientos de la metodología general.

Grupo	N	Precambio 4 ensayos DP 14-17	Poscambio 2 ensayos DP 18-19
0.1-0.01	9	0.1 %	0.01 %
0.01-0.01	10	0.01 %	0.01 %

Tabla 14. Esquema del diseño del Experimento 12.

Resultados y discusión. La figura 28 muestra el porcentaje de ganancia de peso en función de los ensayos para cada uno de los grupos. El ANOVA para el porcentaje de ganancia de peso durante la fase de precambio alcanzó la significación estadística para un efecto principal de Grupo [$F(1, 17) = 16.22, p < .0001$] y Ensayo, [$F(3, 51) = 13.77, p < .0001$], y la interacción Grupo x Ensayo [$F(3, 51) = 3.55, p < .021$]. ANOVAs de una vía para cada sesión hallaron que el porcentaje de ganancia de peso fue significativamente menor en los animales que recibieron 0.1% de quinina (i.e., Grupo Experimental 0.1-0.01), en comparación a aquellos infundidos con 0.01% (i.e., Grupo Control 0.01-0.01) en los ensayos 2 [$F(1,17) = 15.24, p < .001$], 3 [$F(1,17) = 17.20, p < .0007$] y 4 [$F(1,17) = 21.67, p < .0002$ – figura 28]. El ANOVA para la fase de poscambio reveló un efecto principal de Ensayo [$F(1, 17) = 6.87, p < .018$] y una interacción Grupo x Ensayo [$F(1, 17) = 14.83, p < .001$]. Subsecuentes ANOVAs de una vía indicaron que el Grupo 0.1-0.01 consumió significativamente más 0.01% de quinina que el Grupo 0.01-0.01 en el primer ensayo de poscambio [$F(1, 17) = 5.26, p < .035$ – figura 28].

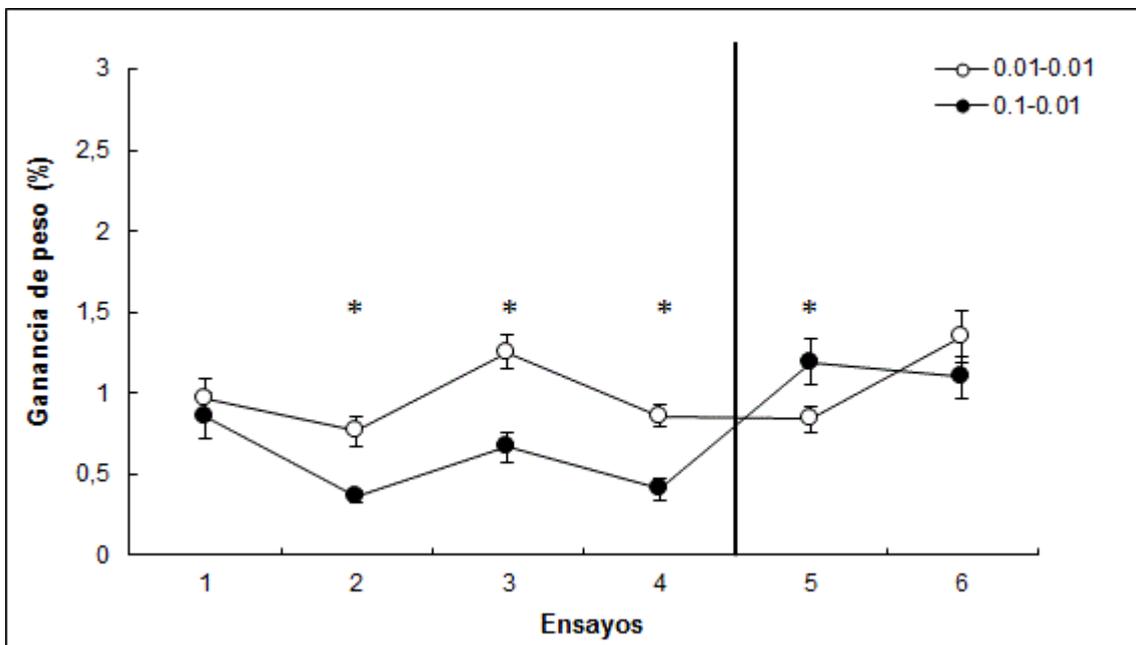


Figura 28. Porcentaje de ganancia de peso promedio (\pm ETM) del Grupo Control 0.01-0.01 (puntos blancos) y Grupo Experimental 0.1-0.01 (puntos negros), en función de los ensayos. La línea vertical negra entre los ensayos indica el cambio de fase entre el precambio y poscambio. * $p < .05$.

En cuanto al análisis de las respuestas de reacción al sabor, pruebas t para el último ensayo de precambio indicaron que los animales que recibieron 0.1 de quinina mostraron una diferencia significativamente mayor en frecuencia [$t(17) = 4.12, p < .001$] y duración [$t(17) = 3.92, p < .001$] de paw treading en comparación al Grupo 0.01-0.01 (figuras 29 y 30, respectivamente). No se hallaron diferencias significativas para el resto de las reacciones ($p > .05$).

El ANOVA para estas respuestas en los ensayos de poscambio reveló un efecto principal de Ensayo para la duración de paw licking [$F(1, 17) = p < .01$]. Comparaciones planeadas indicaron mayor duración de paw licking durante el primer ensayo de poscambio en el Grupo 0.1-0.01 en relación al Grupo 0.01-0.01 [$F(1, 17) = 6.22, p < .024$ – figura 25]. El ANOVA para paw treading halló significativa la interacción Grupo x Ensayo [$F(1, 17) = 5.20, p < .036$]. El análisis subsecuente reveló que la duración de paw treading fue significativamente menor en el primer ensayo de poscambio para el Grupo 0.1-0.01 en comparación al Grupo 0.01-0.01 [$F(1, 17) = 5.06, p < .04$ – figura 30].

Los ANOVAs para chin rubbing y head shaking no alcanzaron la significación estadística para efectos principales ni interacciones entre factores. Sin embargo, comparaciones planeadas indicaron que el Grupo 0.1-0.01 expresó menor cantidad de chin rubbing que el Grupo 0.01-0.01 durante el primer ensayo de poscambio [$F(1, 17) = 5.01, p < .04$] (ver figura 29).

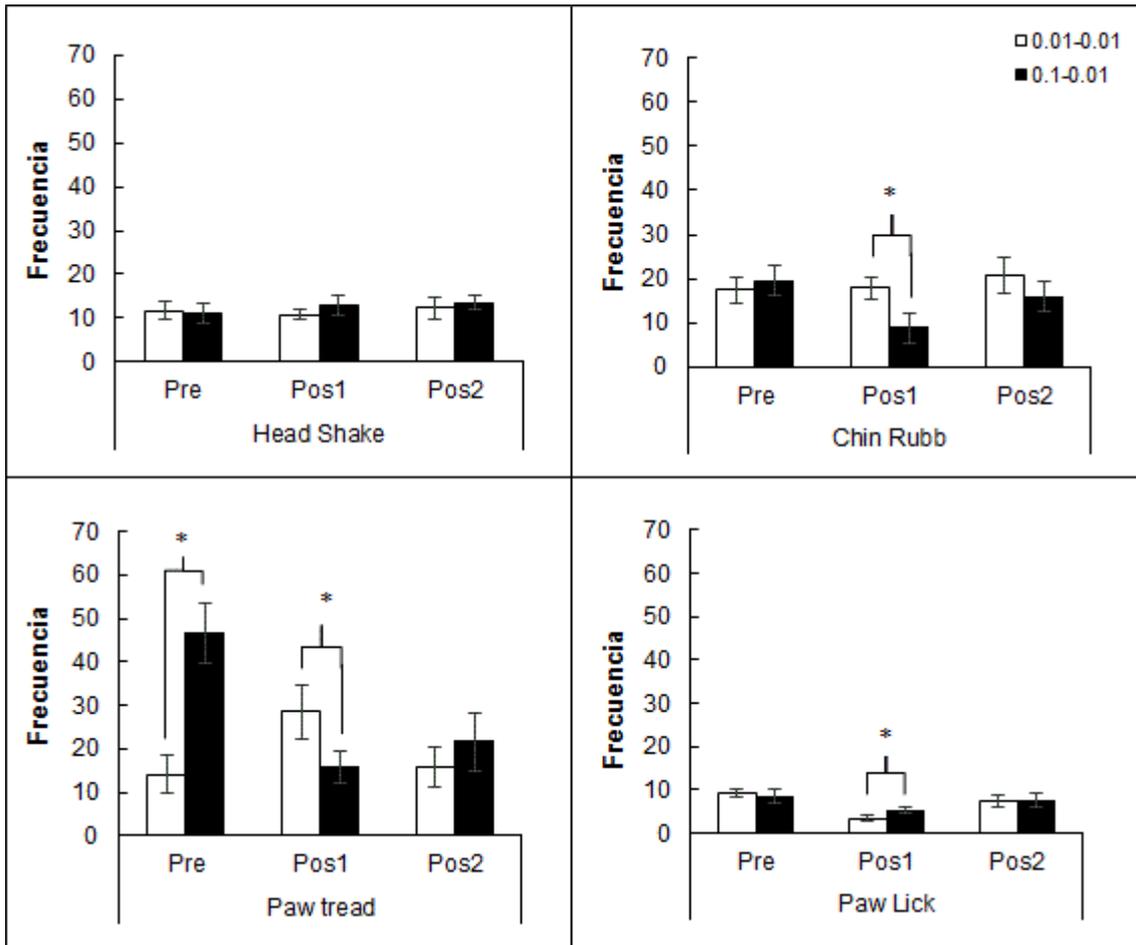


Figura 29. Frecuencias promedio (\pm ETM) de (A) head shake, (B) chin rubb, (C) paw tread y (D) paw lick del Grupo Control (barras blancas) y Experimental (barras negras) durante el último ensayo de precambio y los dos ensayos de poscambio. * $p < .05$.

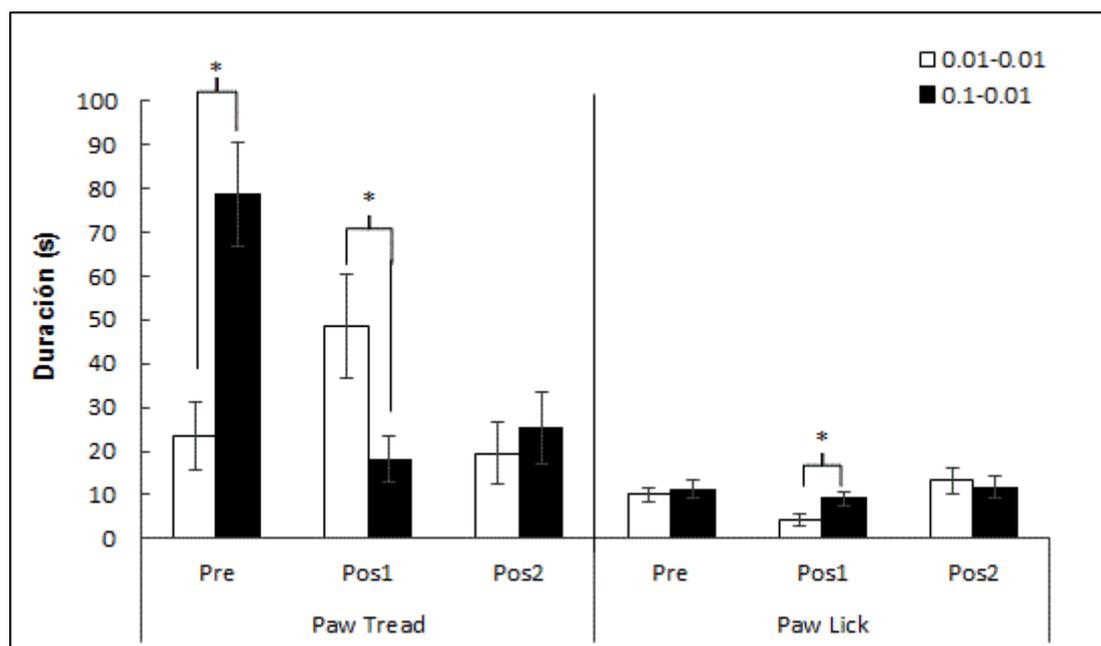


Figura 30. Duración promedio (\pm ETM) de (Izq) paw tread y (Der) paw lick, respectivamente, del Grupo Control (barras blancas) y Experimental (barras negras) durante el último ensayo de precambio y los dos ensayos de poscambio. * $p < .05$.

En resumen, los resultados de este experimento indican que es posible observar CPSc en ratas de DP 18, utilizando diferentes concentraciones de una solución innatamente aversiva, como la quinina. Este efecto se observó en el primer ensayo de poscambio a nivel de consumo (i.e., mayor porcentaje de ganancia de peso) y de las respuestas de reacción al sabor hedónicas (i.e., mayor duración de la paw lick) y aversivas (i.e., menor duración y cantidad de paw tread y menos chin rubbing). Este hallazgo es novedoso puesto que constituye el primer estudio hasta el momento en el que se evaluó CPSc modificando las concentraciones de una solución amarga.

Discusión general

En este capítulo se describió una serie de experimentos, en los que se focalizó sobre la evaluación de los efectos de contraste negativo y positivo en ratas infantiles, utilizando preparaciones consumatorias. En conjunto, los resultados indican que estos fenómenos ocurrirían en el DP 18 expresándose tanto a nivel de consumo como en las respuestas de reacción al sabor, ante la devaluación de una solución apetitiva (Experimentos 8 y 9) y la devaluación de

una solución aversiva (Experimento 12). Posiblemente, también al experimentar el cambio de un sabor a otro (Experimento 11).

Los experimentos 8 a 10 constituyeron el paso inicial para el estudio del CNSc mediante la devaluación de una solución azucarada (i.e., 12% a 2%). Los resultados sugieren que el CNSc se expresaría al DP 18, independientemente de si el cambio de solución ocurre con un intervalo de 3 hs. (Experimento 8) o 24 hs. (Experimento 9), con una duración de un solo ensayo. Esto constituye una discrepancia con lo que ocurre en ratas adultas, en quienes el CNSc se recupera luego de 2 a 4 ensayos (Justel, Ruetti, Mustaca & Papini, 2012; López-Seal, Pellegrini & Mustaca, 2010). Es probable que dicha diferencia se deba a una capacidad más limitada de las ratas infantas de recordar el reforzador de la fase de precambio, una respuesta emocional más reducida, o bien a ambos factores (Amsel, 1992; Campbell & Spear, 1972; Rovee-Collier, 1999).

El efecto de CNSc devaluando una solución azucarada no se observó en crías de DP 10-15 o DP 13-18 bajo los mismos parámetros. Esto sugiere que la edad de emergencia de CNSc se ubicaría en el DP 18, constituyendo el primer antecedente sobre la edad de aparición de dicho fenómeno y primera evidencia de CNSc en ratas infantas. La ontogenia del efecto de contraste se estudió con procedimientos instrumentales, ubicando la edad de aparición en el DP 25 (Chen et. al., 1981). La diferencia entre el momento que emergen ambos tipos de contraste puede deberse a que las áreas cerebrales que subyacen en ambos fenómenos difieren. Varios estudios indican que el CNSi está regulado principalmente por el hipocampo (Flaherty et al., 1998; Salinas & White, 1998), mientras la estructura principalmente implicada en la expresión del CNSc sería la amígdala (Becker et. al., 1984; Capobianco & Hamilton, 1973; Flaherty & Hamilton, 1971; Flaherty et. al., 1989; Liao & Chuang, 2003). Tales áreas alcanzan la madurez en diferentes momentos de la ontogenia de la rata. El hipocampo finaliza su desarrollo entre el DP 25 y 30 (Amsel & Stanton, 1980), mientras que la amígdala alcanza su desarrollo alrededor del DP 14 (Berdel et al., 1997). En los experimentos 8 y 9 se halló CNSc al DP 18, no obstante, el entrenamiento tuvo comienzo al DP 14. Esto podría sugerir que una condición para la expresión del CNSc sea que la amígdala haya alcanzado su máximo

desarrollo durante la fase de precambio. Tal posibilidad se apoya en los resultados del experimento 10, en cual no se halló CNSc cuando la fase de cambio ocurrió al DP 14.

Otra posibilidad de que el CNSc acontezca con anterioridad al CNSi es que requieran diferentes tipos de memorias. Si bien ambos efectos requieren de la formación de expectativas de los reforzadores, es probable que los procedimientos consumatorios impliquen aprendizajes que requieren de la memoria de reconocimiento, mientras que las preparaciones instrumentales precisen de una memoria de evocación. En el primer caso, el animal debe entrar en contacto con el reforzador y compararlo con el previamente recibido. En el segundo, debe anticipar la devaluación del reforzador para ajustar su respuesta, por ejemplo, su velocidad de recorrido en un corredor recto (Papini & Pellegrini, 2006).

Un aspecto a considerar del protocolo utilizado es que el entrenamiento se llevó a cabo con dos ensayos por día. Si bien el experimento 9, en el cual el cambio de 12% a 2% ocurrió en días diferentes, permitió controlar efectos de carry over *intersesión* (i.e., procesamiento periférico del sistema nervioso), no se puede desestimar completamente la intervención de efectos de carry-over *intrasesión* (Weinstock, 1954, 1958). Futuros experimentos, en los que se utilicen un ensayo por día en las edades evaluadas podrán traer luz sobre este aspecto.

Un objetivo adicional y novedoso en esta serie de estudios fue medir respuestas de reacción al sabor ante situaciones de cambios sorpresivos de los reforzadores. Un amplio cuerpo de evidencia indica que estas reacciones dan cuenta de la valoración hedónica que los sujetos realizan de los reforzadores gustativos y que un patrón de respuestas típico puede cambiar en función de experiencias previas (Berridge, 2000; Gavalerna et al., 1993; Grant et al., 2012; Itoga et al., 2016; Pautassi et al., 2008; Rana & Parker, 2008; Tindell et al., 2006). En ese sentido, los resultados de los experimentos 8 y 9 reflejan que al DP 18, los animales que experimentaron la devaluación de sacarosa (i.e., 12% a 2%) mostraron mayores respuestas aversivas (i.e., head shaking y chin rubbing) en comparación con el grupo control no devaluado. En otras palabras,

las crías responden ante la solución devaluada como si fuera una solución aversiva (e.g., quinina o ácido cítrico), sugiriendo un cambio en la valoración hedónica hacia la sacarosa.

Por otra parte, las crías de DP 17 (experimento 10) no mostraron CNSc con la medida de consumo, aunque incrementaron la conducta de chin rubbing durante el primer ensayo de devaluación del reforzador. Existen antecedentes que reportan divergencias entre las respuestas de consumo y de reacción al sabor. Estudios sobre condicionamiento de aversión al sabor, mostraron que agentes antieméticos no interfieren con la respuesta de consumo mediada por litio, pero sí con las respuestas orofaciales condicionadas (Limebeer & Parker, 2000; Parker & MacLeod, 1991; Pautassi et al., 2008). Asimismo, cuando se utilizaron drogas de abuso (e.g., anfetamina, cocaína, morfina) para generar aversión al sabor condicionada los animales evitaron el sabor dulce, pero emitieron un patrón de respuestas apetitivas ante la solución (Parker, 1995). Esta posibilidad sugiere que el test de reactividad al sabor constituye una medida más sensible que el consumo para evaluar procesos emocionales.

El siguiente paso que se planteó en la evaluación de los efectos de contraste fue estudiarlos usando diferentes sabores, en lugar de concentraciones de una misma solución. Los resultados indican que el consumo y las respuestas afectivas cambian en función del orden en el que se administren los sabores. Concretamente, las crías que recibieron sacarosa *luego* de la quinina mostraron un incremento significativo del consumo, en comparación a los animales que recibieron la sacarosa *antes* que la quinina. El orden de exposición de los sabores también afectó la expresión de las respuestas de reacción. La respuesta hedónica de mouthing aumentó y las respuestas de disgusto chin rubbing y paw treading disminuyeron cuando las crías obtuvieron la solución azucarada *luego* de la quinina, en relación a cuando recibieron sacarosa por primera vez. De manera inversa, cuando los animales obtuvieron quinina *luego* de la sacarosa el consumo del sabor amargo disminuyó significativamente, la emisión de mouthing y paw treading se redujo mientras que el wall climbing aumentó significativamente.

Los resultados del experimento 11 también resaltan la importancia de las experiencias previas sobre la evaluación de las recompensas. La expresión de un patrón apetitivo más intenso ante la sacarosa *luego* de experimentar un sabor amargo y en comparación a los niveles alcanzados *antes* de recibir la solución amarga, se complementan con lo observado en los experimentos 8 y 9 (i.e., patrón de respuestas aversivas ante la devaluación de sacarosa), y sugiere que las crías podrían haber experimentado un efecto de contraste positivo. Esta hipótesis cobra fuerza al comparar los niveles de respuesta de mouthing, chin rubbing y paw treading cuando los animales recibieron sacarosa *luego* de quinina, en contraste a cuando recibieron la solución dulce por segunda vez consecutiva. Las crías expresaron más mouthing y menos chin rubbing y paw treading al experimentar la solución azucarada *luego* de la solución amarga que cuando la vuelven a recibir en el ensayo siguiente. Por otra parte, las comparaciones entre este último ensayo y lo ocurrido cuando se recibió la sacarosa por primera vez indican ausencia de diferencias para estas variables. En conjunto, los datos sugieren que habría una primera respuesta de euforia al obtener la solución apetitiva ante la expectativa de recibir una solución aversiva. Tal emoción resulta transitoria puesto que las crías revirtieron el patrón de respuestas de reacción al sabor (i.e., disminución de mouthing y aumento de chin rubbing y paw tread) tras experimentar la sacarosa por segunda vez consecutiva, comportándose de forma similar a cuando recibieron la sacarosa por primera vez. Este hallazgo es novedoso puesto que no se encontraron antecedentes que manipulen sabores dulces y amargos para estudiar la “devaluación” y “revalorización” de reforzadores, en ratas infantiles.

El amplio espectro de comportamientos abordados en el experimento 11 contribuye al análisis de las respuestas de reacción al sabor durante la ontogenia de rata. Son escasos los trabajos que evalúan de forma sistemáticas estas conductas y en la mayoría de los casos se limitan a medir solo algunas respuestas (Hall & Bryan, 1981; Hoffman et al., 1991). En este estudio se intentó dar cuenta de un abanico más amplio, coincidiendo con aquellas observadas en animales adultos y sumando otras más características en esta edad como frecuencia y duración de wall climbing. Un claro ejemplo de la importancia de tomar en cuenta esta conducta se observó al evaluar el orden

en el que se experimenta un sabor amargo (i.e., qui1 vs qui2). Tanto la frecuencia como duración de wall climbing aumentó tras recibir quinina *luego* de sacarosa, sugiriendo que la solución amarga se valora como más negativa respecto a cuándo se percibe por primera vez. Esta afirmación cobra fuerza al observar una disminución en la duración de la conducta apetitiva de mouthing, en la misma condición.

Por último, en el experimento 12 se propuso un método alternativo al tradicional para la evaluación de CPSc en ratas infantiles: devaluación de una solución aversiva. Los resultados fueron contundentes. Cuando las crías de DP 18 experimentaron el cambio de 0.1% a 0.01% de quinina consumieron significativamente más de esta última concentración, en comparación con animales que siempre recibieron 0.01% de quinina. Además, esto se acompañó por una reducción en la emisión de paw tread y chin rubbing (i.e., respuestas del patrón aversivo) y un aumento de paw lick (i.e., respuesta del patrón apetitivo). En su conjunto, los resultados señalan la presencia de CPSc durante la segunda semana de vida de la rata.

Esta constituye la primera evidencia de CPS con soluciones aversivas. Algunos estudios reportan este efecto utilizando un protocolo instrumental y la aplicación de descargas eléctricas. Cándido et al. (2002) entrenaron a ratas adultas en una tarea de evitación de una vía, en la que manipularon la cantidad de tiempo que podían permanecer en un lugar seguro, libre de descargas eléctricas. Encontraron que los animales que solían pasar sólo 1 seg en un lugar seguro después de una descarga eléctrica (fase de precambio), escaparon más rápido hacia el lugar seguro cuando se les permitió permanecer allí 30 seg (fase de poscambio), en comparación con los animales del grupo control que siempre se entrenaron con 30 seg.

Por otra parte, el cambio en el patrón de respuesta afectivas en los animales que pasaron de 0.1% a 0.01% de quinina, sugiere un cambio en el valor hedónico hacia esta solución. Sin embargo, se necesitan más investigaciones para determinar si la reducción de la concentración de quinina resulta en un alivio, como proponen Cándido et al. (2002) para el CPSi, o si la solución aversiva deviene apetitiva. El protocolo propuesto aquí puede

representar una manipulación psicológica que promueve un patrón de respuestas positivo hacia una solución aversiva, similar al observado en experimentos que manipularon fisiológicamente la homeostasis sódica (Tindell et al., 2006). Además, puede resultar una estrategia alternativa a los problemas metodológicos que conlleva la evaluación del CPSc con soluciones apetitivas (e.g., efectos de techo – Flaherty, 1982).

En conclusión, los resultados aquí expuestos constituyen los primeros antecedentes sobre la evaluación de los efectos de contraste negativo y positivo consumatorios en ratas infantiles. Asimismo, establecen el primer precedente en cuanto al estudio de las respuestas de reacción al sabor emitidas ante cambios sorpresivos de los reforzadores. La recurrencia en los datos obtenidos por ambas medidas (i.e., consumo y respuestas de reacción al sabor) a lo largo de esta serie de experimentos, sugieren fuertemente que el recibir algo diferente a lo que se espera puede resultar en una situación lo suficientemente saliente como para impactar sobre la valoración que se realiza sobre los reforzadores. Por lo tanto, los resultados fortalecen las explicaciones que postulan la existencia de un valor relativo de los reforzadores y que destacan los aspectos emocionales en los efectos de contraste.

Capítulo VII

Conclusiones Generales

*“La infancia tiene sus propias maneras de ver, pensar y sentir;
nada hay más insensato que pretender
sustituirlas por las nuestras”.*

Jean Jacques Rousseau (1712-1778)

Una lectura de la frase que nos propone Jean Jacques Rousseau sugiere que las primeras etapas de la vida cuentan con características propias, diferente a la de los adultos. Vasta evidencia ha tirado por tierra aquella visión sobre los procesos que ocurren en etapas tempranas del desarrollo como simples versiones inmaduras de lo que sucede en la adultez. La existencia de periodos críticos y sensibles, por ejemplo, da lugar a aprendizajes extraordinarios tendientes a garantizar la supervivencia de las crías. Éstos, a su vez, son posibles gracias a mecanismos neurobiológicos específicos y complejos (ver Ifrán, Suárez & Kamenetzky, 2014). Un claro ejemplo en este sentido es lo que ocurre con el aprendizaje de olores en ratas. Existe un amplio cuerpo de evidencia que señala que su expresión y los mecanismos neurobiológicos que lo subyace son específicos en esta etapa del desarrollo y difiere de los animales adultos. Mientras que crías de ratas menores a 10 días de vida desarrollan preferencia por un olor que previamente fue apareado a un estímulo aversivo, los adultos muestran miedo condicionado, lo cual se ve reflejado en la evitación de dicho olor (Levine, 2001; Sullivan, Landers, Ycaman & Wilson, 2000). Esta forma de operar en animales infantiles obedece a ventajas adaptativas para garantizar la supervivencia de la cría. Neurobiológicamente se sustenta por una hipofuncionalidad de la amígdala (principal estructura cerebral involucrada en aprendizajes de miedo y aversiones) y bajos niveles en sangre de la hormona del estrés, la corticosterona. Ambos factores coinciden con la duración del periodo sensible para olores (Moriceau & Sullivan, 2005; Upton & Sullivan 2010). Estas características particulares son importantes a tener en cuenta al estudiar procesos durante etapas tempranas de la ontogenia puesto

que pueden modular fenómenos relevantes tales como la evaluación hedónica de los reforzadores.

En la misma dirección, Amsel y Stanton (1980) indican que el estudio de procesos durante etapas tempranas del desarrollo debe contemplar y ajustarse a las peculiaridades de estos estadios. Por ejemplo, en los estudios de Amsel con ratas pre-destetadas se debió ajustar las dimensiones del corredor recto a la marcha de los animales para obtener medidas fiables, así como variar el tipo de reforzador por el que los animales debían correr. Pudo establecer que, si bien la madre constituye en sí misma un reforzador potente, si su presencia se acompaña de pulsos de leche, esto deviene una recompensa de mayor magnitud (Burdette et al, 1976). Esta idea es la que guió el desarrollo de los experimentos 1 a 4 llevados a cabo en ratas recién nacidas (Capítulo I). La evaluación de respuestas consumatorias en esta etapa del desarrollo requirió la implementación de una técnica que se ajustara a las capacidades que puede desplegar un animal con pocas horas de vida. La técnica de pezón artificial mostró ser eficaz en ese sentido puesto que facilita el consumo voluntario de soluciones, a la vez que permite adjuntar olores de forma simultánea a la presentación de sabores (Petrov et.al., 1997). Con la implementación de este procedimiento, los experimentos del capítulo I mostraron que la pre-exposición a un olor impacta sobre las respuestas consumatorias hacia un pezón artificial que proporciona un reforzador aversivo (i.e., solución de quinina) pero no ante una recompensa apetitiva (i.e., solución de sacarina). Tal resultado sugiere que en las primerísimas etapas del desarrollo de la rata existe un procesamiento particular de las recompensas, en el que cobran singular relevancia los procesos olfatorios. Estos constituyen experimentos iniciales en dirección a evaluar este fenómeno y con ellos se abren camino diferentes preguntas: ¿Cuán específico es este fenómeno?, ¿Es posible su expresión al utilizar otros sabores aversivos, como ácido cítrico? ¿Ocurre de la misma manera en sucesivos días posnatales?, ¿Existe un periodo sensible para su expresión? Futuros experimentos permitirán profundizar en éstas y otras preguntas, así como en los posibles mecanismos implicados.

En cuanto a la siguiente etapa ontogenética abordada en esta tesis, se debió implementar un segundo procedimiento consumatorio que permitiera el

consumo voluntario de las soluciones, contemplando las características propias de las primeras dos semanas de vida de la rata. Durante ese periodo, progresivamente desarrollan sus conductos auditivos y visuales al mismo tiempo que afinan la motricidad de su marcha (Bolles & Woods, 1964), por lo que paradigmas consumatorios típicamente utilizados en adultos (e.g., discriminar el lugar donde se ubica la recompensa, aproximarse y consumir voluntariamente), pueden resultar inadecuados para la evaluación en estas etapas. En su lugar, se empleó un procedimiento mediante el que los animales reciben las soluciones directamente en la boca, pero con la posibilidad de rechazarlas o consumirlas voluntariamente. El paso siguiente consistió en establecer los parámetros mediante los que posteriormente se evaluaron algunos EPR. Los experimentos 5 a 8 permitieron establecer las magnitudes grande y pequeña de un reforzador apetitivo así como la cantidad de ensayos para alcanzar la asíntota en la curva de aprendizaje de la respuesta consumatoria.

Durante estos experimentos, además, se evaluó dos EPR: EMREc (Experimento 6) y CNSc (Experimento 7). Pese a no haber obtenido diferencias significativas entre los grupos durante las fases de cambio de la solución en ninguno de los casos, los patrones de respuesta diferenciales durante la fase de precambio sugiere que los animales de DP 8 cuentan con la capacidad de responder en función de la magnitud del reforzador, lo cual nos sugiere que son capaces de discriminar entre dos concentraciones de una misma solución. Asimismo, se observó que esta capacidad ocurre desde las 3 hs. de vida de la rata, durante la primera experiencia de succión a través de un pezón artificial. Estos patrones de respuestas diferenciales ocurrieron tanto frente a reforzadores apetitivos (i.e., 0.015% y 0.1% de sacarina) como ante aversivos (e.g., 0.1% y 0.2% de quinina). Algunos trabajos con ratas neonatas sugieren que las crías responden diferencialmente a sabores básicos (i.e., dulce, salado, ácido y amargo – Nizhnikov et. al., 2002). No obstante, hasta el momento de escritura de esta tesis esta constituye la primera evidencia de discriminación de magnitudes de un reforzador en ratas neonatas. La expresión de EMRAc fue una constante a lo largo de todos los experimentos realizados e independientemente de si se trató de una solución dulce o amarga y el

momento ontogénico que se evaluara. Los estudios de Stanton y Amsel (1980) indican que el EMRA está presente al DP 11 cuando se evalúa con un corredor recto. Sin embargo, los resultados aquí descritos sugieren que este efecto ya se expresa a las 3 hs. de vida de la rata. Si bien éste no constituye un EPR, sí resulta un requisito previo para su expresión poder discriminar entre la magnitud de los reforzadores y responder en función de dicho valor. Futuros experimentos podrían determinar si esto ya ocurre desde la etapa fetal. Existe evidencia donde se muestra que desde la última fase de la gestación las ratas perciben estímulos olfativos y gustativos (Lipchock et.al., 2011) y que los aprendizajes que ocurren en etapas prenatales pueden alterar conductas posteriores al parto, tales como ingesta o preferencia por olores (Abate et.al., 2002; Domínguez et. al., 1998; Molina & Spear, 2001; Schaal et.al., 2000; Stickrod et. al., 1982).

Algunos antecedentes en humanos indican que los bebés pueden discriminar entre diferentes sabores y concentraciones de un mismo sabor, midiendo una variedad de respuestas consumatorias como ritmos de succión (Crook, 1978), cantidad de mililitros consumidos (Desor, Maller & Turner, 1973), presión de la lengua sobre un pezón artificial (Nowlis & Kessen, 1976), cantidad de succiones por minuto (Engen & Lipsitt, 1974) o duración de los episodios de succión usando un pezón artificial (Crook & Lipsitt, 1976). Los estudios con ratas neonatas también sugieren que pueden procesar sabores en los primeros momentos de vida posnatal (Gemberling & Domjan, 1982; Gemberling et al., 1980) e incluso prenatal (Mickley, Remmers-Roeber, Crouse & Peluso, 2000) y que responden diferencialmente hacia un pezón artificial que proporciona distintos tipos de sabores (Nizhnikov et. al., 2002). Sin embargo, son escasos los estudios que reportan discriminación de concentraciones de un mismo sabor.

Para poder concluir con mayor seguridad que un fenómeno no se expresa a cierta edad es indispensable la variación sistemática de los parámetros bajo los que se evalúa (Amsel & Stanton, 1980). Dado que los EPR constituyen un amplio espectro de fenómenos, la tesis se enfocó en la evaluación de uno de ellos: efecto de contraste. Este efecto se exploró devaluando una solución de sacarosa de 12% a 2% (i.e., CNSc), disminuyendo

la concentración de 0.1% a 0.01% de quinina (i.e., CPSc) y presentando de manera sorpresiva sabores dulce y amargo (i.e., CNSc y CPSc). Independientemente del tipo de reforzador que se utilizara, el fenómeno se expresó en el DP18. En el caso del CNSc con soluciones apetitivas, los datos sugieren que la edad de emergencia se ubicaría en el DP 18 puesto que cuando la devaluación de sacarosa ocurre al DP 15 y al DP 17, las crías no expresan un consumo significativamente menor que los controles. Esto representa una clara diferencia con lo reportado respecto al CNSi, para el cual se estableció que aparece en el DP 25 a 30 (Chen et al., 1981) y apoya los estudios que sugieren una disociación en los mecanismos neurobiológicos que subyacen a ambos fenómenos (Amsel & Stanton, 1980; Becker et al., 1984; Capobianco & Hamilton, 1973; Flaherty & Hamilton, 1971; Flaherty et al., 1989; Flaherty y cols., 1998; Flaherty et al., 1995; Flaherty et al., 1979; Liao & Chuang, 2003; Salina & White, 1998). Además, este hallazgo es acorde con la información proporcionada por estudios de neurodesarrollo, en los que se indica que la amígdala (implicada en el CNSc) alcanza su punto máximo de desarrollo al DP 14 (Berdel et al., 1997). Mientras que el hipocampo (área que subyace principalmente al CNSi) al DP 21 (Amsel & Stanton, 1980).

El hecho que el CNSc se haya observado en el DP 18 y no a edades más tempranas podría sugerir que una condición para su manifestación es que la amígdala haya alcanzado su madurez desde el inicio del entrenamiento. Los experimentos 7 y 10 apoyan esta posibilidad dado que cuando la devaluación de sacarosa se experimentó precisamente en el DP 14, el fenómeno no se observó. Además, la ausencia del fenómeno a esa edad no podría explicarse por una experiencia acotada con el reforzador durante la fase de precambio ya que el duplicar la cantidad de ensayos desde el experimento 7 al 10 no modificó los resultados. Un aspecto a tener en cuenta es que la implementación de dos ensayos por día podría acarrear la posibilidad de que existan procesos de carry over *intrasesión* en la expresión del CNSc (Weinstock, 1954, 1958). El uso de doble ensayo apuntó a maximizar la cantidad de ensayos que los animales tenían contacto con las soluciones, teniendo en cuenta dos razones. Por un lado, algunos trabajos indican que durante las primeras etapas del desarrollo la tasa de olvido es más rápida que

en etapas posteriores y que, posiblemente, esto se deba más a un déficit en la retención que a una adquisición pobre o débil de un aprendizaje. Por lo tanto, cuanto mayor es el intervalo entre la adquisición y prueba de un aprendizaje, peor es su recuerdo (Campbell & Spear, 1972; Rovee-Collier, 1999). La segunda razón tuvo que ver con aspectos éticos y de bienestar animal, tendientes a minimizar el daño tisular que podía inducir la técnica de canulación en las crías. Futuros experimentos en los que se lleve a cabo este procedimiento, pero utilizando un ensayo por día deberán realizarse para examinar este tema.

En cuanto al CPS, es un fenómeno que ha recibido menos atención que el CNS debido a las dificultades que conlleva su manifestación y replicación (ver Flaherty, 1982; Mellgren, 1972; Shanab, Sanders, & Premack, 1969). Aunque algunos autores cuestionan su existencia (Annicchiarico et al., 2016), otros sugieren que su elusiva expresión obedece a un efecto de techo. La obtención de un contundente CPSc en el DP 18 utilizando soluciones amargas (Experimento 12) proporcionan una alternativa novedosa a las limitaciones que presentan los protocolos tradicionales (i.e., utilizando reforzadores apetitivos) y se erige con una nueva estrategia para profundizar en el estudio de este fenómeno. Asimismo, sugiere que la disminución de una situación aversiva de manera inesperada (i.e., recepción de un sabor amargo de alta concentración) desencadena respuestas emocionales similares a las que se producen ante el incremento de una situación apetitiva (e.g. incremento de la concentración de sacarosa).

Aunque hay estudios que sugieren que el CNS y CPS no serían fenómenos simétricos (Annicchiarico et al., 2016; Crespi, 1942; Flaherty, Becker & Checke, 1983; Tinklepaugh, 1928), resulta llamativo observar que tanto al devaluar una solución azucarada (i.e., CNSc) como al disminuir la concentración de una solución amarga (i.e., CPSc) la duración del fenómeno fue de un solo ensayo. La evaluación de ambos fenómenos en animales adultos indica que la duración entre ellos difiere, siendo de menor duración el CPS (Flaherty, 1996; Flaherty et al., 1983). Es posible que la expresión del efecto de contraste, de forma similar a lo observado con otros EPR, presente características particulares durante las primeras semanas de vida, en

comparación con lo observado en otros momentos del desarrollo. El ERPE, por ejemplo, se manifiesta con una gran magnitud entre el DP 21-23, pero ésta disminuye en edades más avanzadas (Burdette et. al., 1976). Además, la variación de parámetros como intervalos de tiempo entre fases o cantidad de ensayos de readquisición, afecta diferencialmente la expresión del ERPE dependiendo del momento del desarrollo en el que se evalúe (Brake et. al., 1980). Asimismo, procesos de memoria podrían explicar estos resultados. Algunos estudios en animales adultos establecen que a medida que aumenta el intervalo de retención, se produce una declinación progresiva de la precisión del recuerdo (Steckler, Saugal, Aggleton & Drinkenburg, 1998) y estudios ontogenéticos indican que la tasa de olvido es más rápida durante la infancia que en la adultez (Campbell & Spear, 1972; Rovee-Collier, 1999). Esta posibilidad se apoya en los resultados expuestos en esta tesis. Cuando se utilizó un intervalo de 3 hs. entre el cambio de solución y se repitió esta secuencia al día siguiente (Experimento 8), el CNSc fue muy claro en el primer día de devaluación y marginal en el segundo. Mientras que cuando el intervalo aumentó a 24 hs., solo fue evidente en el primer ensayo de poscambio (Experimento 9).

Por otra parte, una inspección visual de los gráficos de consumo, parece sugerir que el CPSc se expresó con una magnitud similar al CNSc con soluciones apetitivas. No obstante, la comparación directa entre ambos experimentos es solo especulativa, dado que podrían existir diferencias en cuanto a los parámetros bajo los que se observó estos fenómenos. Ellas no solo se refieren al tipo de reforzador utilizado sino también a la cantidad de ensayos en ambas fases y consecuentemente el intervalo entre ensayos. La profundización en el estudio de estos fenómenos puede arrojar luz sobre las similitudes y diferencias entre ambos tipos de contraste y entre su manifestación en etapas tempranas y posteriores del desarrollo. Sin embargo, resulta necesario realizar más experimentos tendientes a dilucidar estos tópicos. Por ejemplo, un primer paso en esa dirección sería determinar la intensidad de los estímulos gustativos utilizados, así como equiparar la cantidad de ensayos en ambas fases para luego evaluar y comparar ambos fenómenos bajo parámetros similares. Otra posibilidad para traer luz sobre este

tema es delimitar la edad de emergencia del CPSc evaluando diferentes rangos de edades y comparar si coincide con la edad de emergencia del CNSc.

Cuando se estudiaron las respuestas ante sacarosa y quinina, en el Experimento 11, se observó una disminución en el consumo de quinina luego de haber recibido sacarosa, sugiriendo un posible efecto de contraste negativo. Al mismo tiempo, también se observó un aumento del consumo de sacarosa luego de haber experimentado quinina, suponiendo un posible efecto de contraste positivo. Una asunción implícita al considerar estos resultados como una expresión de efectos de contraste es que bastaría con una o dos exposiciones al sabor opuesto para que el fenómeno se manifieste. La literatura tradicional y las teorías respecto del CNSc sugieren que se requieren de consecutivas exposiciones al reforzador para generar y fortalecer la expectativa de recibir la recompensa (Amsel, 1992; Flaherty, 1996). El diseño típico de CNSc consta de 10 ensayos para la fase de precambio y 5 para el poscambio. Aunque algunos trabajos recientes reportan que es posible obtener un contundente CNSc al reducir la fase de precambio a 5 ensayos (Justel, Mustaca & Pautassi, 2014; Psyrdellis, Pautassi & Justel, 2016; Psyrdellis, Pautassi, Mustaca & Justel, 2016), aun parece necesario contar con una mínima cantidad para observar el fenómeno. No obstante, es preciso tener en cuenta algunas consideraciones. Una de las principales diferencias con respecto al protocolo tradicional es que en este experimento se utilizó el cambio sorpresivo de un sabor apetitivo a otro aversivo, en lugar de la devaluación de una solución. En este sentido, la utilización de distintos sabores podría constituir una discrepancia más fuerte o saliente que aquella entre dos concentraciones de un mismo sabor. Algunos estudios con ratas adultas indican que la magnitud del efecto de contraste está relacionada directamente con la magnitud de la diferencia entre las concentraciones que se utiliza. Por lo tanto, a menor diferencia entre una y otra concentración de sacarosa, menor será la magnitud del CNSc (Flaherty, 1996; Papini & Pellegrini, 2006; Ortega, Daniel, Davis, Fuchs & Papini, 2011). Asimismo, existen trabajos en los que se reportó que el uso combinado de reforzadores apetitivos y aversivos (i.e., comida + descargas eléctricas) durante la fase de adquisición y extinción de una respuesta instrumental tiene efectos similares a los observados con un

programa de reforzamiento parcial. En otras palabras, con ambos programas se obtuvo una resistencia al castigo y a la extinción (Brown & Wagner, 1964). En línea con esto, algunos autores sostienen que la ausencia total de un reforzador constituye una situación más aversiva que la disminución de una recompensa (Amsel, 1992). Sin embargo, la ausencia de controles claves, como un grupo de animales que hayan recibido siempre quinina y otro siempre sacarosa, añadido a las grandes diferencias con el diseño tradicional (e.g., ensayos consecutivos para cada fase, cantidad de ensayos, utilización de grupos independientes) obligan a tomar con cautela esta interpretación.

Uno de los principales objetivos de la tesis fue evaluar las respuestas de reacción al sabor ante cambios sorprendentes de los reforzadores. La evaluación de un amplio repertorio de conductas de reacción al sabor durante etapas tempranas de la ontogenia (Experimento 11) proporcionó información sobre la importancia de medir comportamientos que no se consideran relevantes en los patrones aversivos y hedónicos en ratas adultas. Parker (1995) llevó adelante correlaciones entre la totalidad de las respuestas del patrón hedónico y aversivo en la rata adulta, estableciendo que las respuestas que más fielmente dan cuenta del patrón aversivo son gape, chin rubb y paw tread, y aquellas que representan mejor el patrón hedónico son paw lick y protrusiones linguales. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis avalan la propuesta de que respuestas como mouthing, wall climbing y head shake pueden resultar sensibles a la hora de detectar cambios en las valoraciones hedónicas ante cambios sorprendentes de los reforzadores (Experimentos 8 y 11). Además, son varios los trabajos que incorporaron estas respuestas para medir cambios hedónicos durante etapas tempranas del desarrollo (Arias & Chotro, 2005a; 2005b; 2006b; Arias et al., 2010; Díaz-Cenzano & Chotro, 2010a; 2010b; Hoffman et al., 1991; Pautassi et al., 2008; Schwartz & Grill, 1985), resaltando la importancia de su estudio durante las primeras etapas de vida.

La implementación de la técnica de canulación constituyó una doble ventaja puesto que permitió obtener una medida de consumo voluntario adecuándose a las capacidades de las crías, a la vez que permitió registrar las respuestas afectivas de reacción al sabor. Los resultados de los experimentos expuestos en el capítulo VI indican que los patrones de respuestas hedónicas y

aversivas varían al experimentar un cambio sorpresivo del reforzador, coincidiendo con los datos de consumo. El aumento de las respuestas aversivas tras experimentar una devaluación de sacarosa (Experimentos 8 y 9) o quinina luego de sacarosa (Experimento 11) y la disminución del patrón aversivo junto al aumento de las respuestas hedónicas al pasar de 0.1% a 0.01% de quinina (Experimento 12) o recibir sacarosa luego de quinina (Experimento 11) sugieren un cambio en la valoración hedónica hacia estos reforzadores. Este tipo de variaciones en los patrones de reacciones típicas hacia estímulos gustativos se encontró en una amplia variedad de estudios experimentales tanto en animales adultos como infantes. En la mayoría de ellos, un agente externo, como la aplicación de LiCl/etanol para generar malestar (Gavalerna et al., 1993; Itoga et al., 2016; Parker & MacLeod, 1991; Pautassi et al., 2008; Rana & Parker, 2008) o la inducción de depleción sódica (Flynn et al., 1991; Gavalerna et al., 1993; Tindell et al., 2006), produjo el cambio en las respuestas de reacción al sabor. Por primera vez, los datos obtenidos en esta tesis indicarían que el hecho de experimentar un cambio sorpresivo de un reforzador resulta una situación lo suficientemente saliente como para impactar sobre la valoración afectiva de los reforzadores. Este hallazgo proporciona apoyo a las teorizaciones que postulan a la pérdida de los reforzadores o su cambio sorpresivo como situaciones aversivas (Daly, 1974; Papini, Fuchs & Torres, 2015). Además, resaltan la importancia que pueden tener las expectativas sobre la valoración de las recompensas, fortaleciendo las teorías que postulan la existencia de un valor relativo de los reforzadores y que destacan los aspectos emocionales en los efectos de contraste (Amsel, 1958, 1992; Flaherty 1996). Asimismo, ubica a los protocolos de contraste como una posible manipulación psicológica, entendida en los términos de Berridge (2000) y proporciona nueva evidencia empírica a las teorizaciones que proponen al TRS como una medida objetiva de valoraciones afectivas (Berridge, 2000; Steiner et al., 2001).

Los resultados obtenidos en el capítulo I también podrían considerarse otra evidencia de manipulaciones psicológicas. La mera exposición a un olor durante el periodo sensible para el aprendizaje de olores modificó las respuestas hacia una solución modernamente aversiva, cuando se proporciona

de forma simultánea con la clave olfativa. Como se abordó en el capítulo IV, una condición imprescindible para considerar una manipulación como psicológica es la de observar un patrón de respuestas opuestas al típicamente suscitado por un sabor luego de experimentar situaciones relevantes. Dada la particular importancia que reviste el aprendizaje de olores para la supervivencia de la cría, es posible que la exposición a un olor sin relevancia biológica adquiera saliencia y, consecuentemente, su presencia impacte en las primeras respuestas de succión. Esto resalta la relevancia de incorporar aspectos característicos que tienen lugar en cada ontogenética en el estudio sobre la evaluación de las recompensas. Además, aporta evidencia de que estas modificaciones de las respuestas hacia los reforzadores ocurrirían desde las primeras horas de vida.

En conclusión, esta tesis aporta los primeros antecedentes sobre la evaluación de los efectos de contraste negativo y positivo en ratas infantiles, utilizando como medidas dependientes el consumo y las respuestas de reacción al sabor. La edad de expresión coincide con la maduración de una de las principales áreas implicadas en el efecto de contraste consumatorio, la amígdala. Asimismo, brinda un fuerte apoyo a las teorías que enfatizan los procesos emocionales en este tipo de fenómenos, así como a la existencia de un valor relativo de los reforzadores. A su vez, propone al TRS como una medida confiable para medir tales procesos. Por otra parte, plantea dos estrategias alternativas a los métodos tradicionales para la evaluación de los efectos de contraste negativo y positivo, como la utilización de dos concentraciones de una solución amarga y el cambio de un sabor a otro. También resalta la importancia de tener en cuenta la intervención de procesos específicos en etapas tempranas del desarrollo sobre la posterior valoración hacia reforzadores. Aunque estas estrategias resultan prometedoras para la profundización en el estudio de tales fenómenos y algunas de ellas se erigen como posibles soluciones metodológicas a los problemas que implican su evaluación, son necesarias más investigaciones para establecerlas como tales.

El estudio de las valoraciones afectivas hacia los reforzadores durante las primeras etapas del desarrollo reviste importancia, dado que las experiencias tempranas pueden influir los comportamientos en fases

posteriores. Por ejemplo, la aceptación a las 3 hs. de vida de una sustancia amarga, como la quinina, en presencia de un olor pre-expuesto inmediatamente después del nacimiento podría redundar en la elaboración de estrategias para promover una alimentación saludable. El sabor de las verduras es mayormente amargo, y existe evidencia acerca de que sabores experimentados durante la infancia o en la etapa gestacional, luego son aceptados en etapas posteriores del desarrollo (Beauchamp & Mennella, 2011; Lipchock et al., 2011; Scott, Chih & Oddy, 2012). La promoción de una alimentación a base de verduras, frutas, granos enteros y fibra disminuye drásticamente la incidencia de enfermedades tales como la obesidad, afecciones coronarias y diabetes de tipo II, entre otras enfermedades incapacitantes (Bazzano et al., 2006; Birch, 2006; Larson, Neumark-Sztainer, Hannan & Story, 2007; Liem & Mennella, 2002). Este tipo de dieta no solamente incrementaría la calidad de vida de los individuos, sino que disminuiría considerablemente el gasto en salud pública.

Por otro lado, las experiencias emocionales asociadas a la frustración en etapas tempranas también podrían inspirar estrategias para tolerar situaciones aversivas en etapas posteriores (i.e., resiliencia). Evidencia previa muestra que las experiencias de reforzamiento parcial, posteriormente suscitan respuestas de perseverancia ante la ausencia de reforzador (i.e., ERPE - Amsel, 1992). Investigaciones futuras podrían determinar si experimentar frustración con experiencias moderadamente aversivas durante la infancia podría generar mecanismos de resiliencia durante la adolescencia y la adultez. Datos previos mostraron que en ratas adultas expuestas a una preparación de reforzamiento parcial a las cuales se les inyectaba 1 g/kg de etanol (15% p/v, i.p.), luego no recuperaban la respuesta de consumo en una fase de devaluación, sugiriendo que la atenuación de la experiencia emocional por vía farmacológica, podría redundar en una incapacidad para tolerar la frustración en ausencia de la droga (Kamenetzky, 2008). ¿Será necesaria cierta exposición a experiencias de frustración para desarrollar rasgos de personalidad resilientes? ¿La exposición en etapas tempranas del desarrollo afectará las respuestas hacia los reforzadores en etapas posteriores?

Finalmente, resulta interesante determinar si los mecanismos que subyacen a las respuestas de euforia se corresponden con los de las respuestas de frustración. En esta tesis se muestra que la atenuación de una experiencia aversiva genera una respuesta exacerbada, propio de una respuesta de euforia. Asimismo, se observó que experiencias emocionales están asociadas a este cambio de solución. Esta es la primera evidencia al respecto y necesita replicación en diferentes condiciones experimentales. Sin embargo, resulta interesante poder determinar si las respuestas de euforia también implican mecanismos asociados al estrés, como sucede con las respuestas de frustración y si la intensidad de ambos tipos de respuestas se corresponde. También sería interesante analizar si un estado de euforia provocado por el incremento de una solución apetitiva, o bien por la disminución de una solución aversiva, puede redundar en la atenuación de las respuestas de estrés que se estén experimentando de manera simultánea.

Por otro lado, ante una visión holística de los hallazgos de la tesis resulta sumamente interesante ahondar sobre los efectos a largo plazo sobre la valoración de los reforzadores de las experiencias vividas en las primeras etapas del desarrollo. Una posibilidad consistiría en evaluar si experiencias tempranas con un olor afectan las respuestas hacia la quinina en una situación de CPSc en ratas infantiles, ¿varía la magnitud de este efecto en función de la presencia o ausencia del olor pre-expuesto durante la fase de poscambio? El atractivo de estas cuestiones no tiene lugar a dudas. Estas son algunas de las implicancias de los resultados de la tesis. Con seguridad, el avance de estas líneas de investigación traerá aparejadas nuevas ideas para su aplicación.

Referencias

- Abate, P., Varlinskaya, E.i., Cheslock, S.J., Spear, N.E. & Molina, J.C. (2002). Neonatal activation of alcohol-related prenatal memories: impact on the first suckling response. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 26, 1512 - 1522. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2002.tb02450.x.
- Amsel, A. (1958). The role of frustrative nonreward in noncontinuous reward situation. *Psychological Bulletin*, 55, 102-119. DOI: 10.1037/h0043125.
- Amsel, A. (1962). Frustrative nonreward in partial reinforcement and discrimination learning. *Psychological Review*, 69, 306-328. PMID: 13861049.
- Amsel, A. (1992). *Frustration Theory*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. Appleton. Traducción al castellano en Madrid: Alianza, 1984.
- Amsel, A., Burdette, D.R. & Letz, R. (1976). Appetitive learning, patterned alternation, and extinction in 10-day-old rats with non-lactating suckling as reward. *Nature*, 262, 816-818.
- Amsel, A., & Chen, J. (1976). Ontogeny of persistence: Immediate and long-term persistence in rats varying in training age between 17 and 65 days. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 90, 808-820. DOI: 10.1037/h0077242.
- Amsel, A., Letz, R. & Burdette, D.R. (1977). Appetitive Learning and Extinction in 11-Day-Old Rat Pups: Effects of Various Reinforcement Conditions. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 81, 1166-1167. DOI: 10.1037/h0077381.
- Amsel, A. & Stanton, M. (1980). Ontogeny and Phylogeny of Paradoxical Reward Effects. *Advances in the Study of Behavior*, 11, 227-267. DOI: 10.1016/S0065-3454(08)60119-9.
- Annicchiarico, I., Glueck, A.C., Cuenya, L., Kawasaki, K., Conrada, S.E. & Papini, M.R. (2016). Complex effects of reward upshift on consummatory

- behavior. *Behavioural Processes*, 129, 54–67. DOI: 10.1016/j.beproc.2016.06.006.
- Arias, C. & Chotro, M.G. (2005a). Increased palatability of ethanol after prenatal ethanol exposure is mediated by the opioid system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 82, 434 – 442. DOI: 10.1016/j.pbb.2005.09.015.
- Arias, C. & Chotro, M.G. (2005b). Increased Preference for Ethanol in the Infant Rat after Prenatal Ethanol Exposure, Expressed on Intake and Taste Reactivity Tests. *Alcoholism: clinical and experimental research*, 29, 337–346. DOI: 10.1097/01.ALC.0000156115.35817.21.
- Arias, C. & Chotro, M.G. (2006a). Ethanol-Induced Preferences or Aversions as a Function of Age in Preweanling Rats. *Behavioral Neuroscience*, 120, 710 –718. DOI: 10.1037/0735-7044.120.3.710.
- Arias, C. & Chotro, M.G. (2006b). Interactions between prenatal ethanol exposure and postnatal learning about ethanol in rat pups. *Alcohol*, 40, 51-59. DOI: 10.1016/j.alcohol.2006.10.002.
- Arias, C., Molina, J.C. & Spear, N.E. (2007). Rapid Acquisition of Operant Conditioning in 5-Day-Old Rat Pups: A New Technique Articulating Suckling-Related Motor Activity and Milk Reinforcement. *Developmental Psychobiology*, 49, 576-88. DOI: 10.1002/dev.20236.
- Arias, C., Pautassi, R.M., Molina, J.C. & Spear, N.E. (2010). A comparison between taste avoidance and conditioned disgust reactions induced by ethanol and lithium chloride in preweanling rats. *Developmental Psychobiology*, 6, 545–557. DOI: 10.1002/dev.20460.
- Aron, A., Coups, E.J. & Aron, E.N. (2013). *Statistics for psychology*. New Jersey, USA: Pearson Education, Inc., pp. 340-350.
- Bazzano, L.A., He, J., Ogden, L.G., Loria, C.M., Vupputuri, S., Myers, L. & Whelton, P.K. (2002). Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study1, 2, 3. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 93-99. PMID: 12081821.

- Beauchamp, G. K. & Mennella J. A. (2009). Early flavor learning and its impact on later feeding behavior. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 48, 25 – 30. DOI: 10.1097/MPG.0b013e31819774a5.
- Beauchamp, G.K. & Mennella, J.A. (2011). Flavor Perception in Human Infants: Development and Functional Significance. *Digestion*, 83, 1-3. DOI: 10.1159/000323397.
- 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, 1057-1064. DOI: 10.1016/0091-3057(86)90455-7.
- Becker, H.C. & Flaherty, C.F. (1982). Influence of ethanol on contrast in consummatory behaviour. *Psychopharmacology*, 77, 253-258. DOI: 10.1007/BF00464576.
- Becker, H.C., Jarvis, M.F., Wagner, G.C. & Flaherty, C.F. (1984). Medial and Lateral Amydalectomy Differentially Influences Consummatory Negative Contrast. *Physiology & Behavior*, 33, 707-712. DOI: 10.1016/0031-9384(84)90035-0.
- Bentosela, M., Muzio, R.N. & Mustaca, A.E. (2001). Bases neurofisiológicas del contraste sucesivo negativo. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 33, 299-310.
- 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, 371-376. DOI: 10.1037/0735-7044.120.2.371.
- Berdel, B., Morys´, J., & Maciejewska, B. (1997). Neuronal changes in the basolateral complex during development of the amygdala of the rat. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 15, 755–765. DOI: 10.1016/S0736-5748(97)00022-1.
- Berridge, K.C. (1991). Modulation of Taste Affect by Hunger, Caloric Satiety, and Sensory-Specific Satiety in the Rat. *Appetite*, 16, 103-120.

- Berridge, K.C. (1996). Food Reward: Brain Substrates of Wanting and Liking. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 20, 1-25. DOI: 10.1016/0149-7634(95)00033-B.
- Berridge, K.C. (2000). Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24, 173–198. DOI: 10.1016/S0149-7634(99)00072-X.
- Berridge, K.C., Robinson, T.E. & Aldridge, J.W. (2009). Dissecting components of reward: 'liking', 'wanting', and learning. *Current Opinion in Pharmacology*, 9, 65–73. DOI: 10.1016/j.coph.2008.12.014.
- Birch, L.L. (2006). Child Feeding Practices and the Etiology of Obesity. *Obesity*, 4, 343–344. DOI: 10.1038/oby.2006.45.
- Bolles, R.C. & Woods, P.J. (1964). Ontogeny of behaviour in albino rat. *Animal Behaviour*, 12, 427-441. DOI: 10.1016/0003-3472(64)90062-4.
- Brake, S., Burdette, D.R., Chen, J. & Amsel, A. (1980). Retention of Response Persistence in Weanling and Adolescent Rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 94, 1060-1068. DOI: 10.1037/h0077733.
- Brown, R. T. & Wagner, A. R. (1964). Resistance to punishment and extinction following training with shock or nonreinforcement. *Journal of Experimental Psychology*, 68, 503-507.
- Burdette, D.R., Brake, S., Chen, j. & Amsel, A. (1976). Ontogeny of persistence: Immediate extinction effects in preweanling and weanling rats. *Animal Learning & Behavior*, 4, 131-138. DOI: 10.3758/BF03214023.
- Campbell, B. A., & Spear, N. E. (1972). Ontogeny of memory. *Psychological Review*, 79, 215–236. DOI: 10.1037/h0032690.
- Cándido, A., Maldonado, A., Rodríguez, A. & Morales, A. (2002). Successive positive contrast in one-way avoidance learning. *The quarterly journal of experimental psychology*, 55, 171-184. DOI: 10.1080/02724990143000261.

- Capobianco, S. y Hamilton, L. W. (1973). Increased activity following fornix transection in the female rat. *Physiology & Behavior*, 11, 407-410. DOI: 10.1016/0031-9384(73)90021-8.
- Castro, D.C. & Berridge, K.C. (2014). Advances in the neurobiological bases for food 'liking' versus 'wanting'. *Physiology & Behavior*, 136, 22–30. DOI: 10.1016/j.physbeh.2014.05.022.
- Chen, J., Gross, K. & Amsel, A. (1981). Ontogeny of Successive Negative Contrast and Its Dissociation From Other Paradoxical Reward Effects in Preweanling Rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 95, 146-159. DOI: 10.1037/h0077749.
- Chen, J., Gross, K., Stanton, M. & Amsel, A. (1980). The partial reinforcement acquisition effect in preweanling and juvenile rats. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 16, 239-242. DOI: 10.3758/BF03329532.
- Chen, J., Gross, K., Stanton, M. & Amsel, A. (1981). Adjustment of weanling and adolescent rats to a reward condition requiring slow responding. *Developmental Psychobiology*, 14, 139-45. DOI: 10.1002/dev.420140207.
- Cheslock, S.J., Varlinskaya, E.I., High, J.M. & Spear, N.E. (2003). Higher Order Conditioning in the Newborn Rat: Effects of Temporal Disparity Imply Infantile Encoding of Simultaneous Events. *Infancy*, 4, 157-176. DOI: 10.1207/S15327078IN0402_01.
- Cheslock, S. J., Varlinskaya, E. I., Petrov, E. S. & Spear, N. E. (2000). Rapid and robust olfactory conditioning with milk before suckling experience: Promotion of nipple attachment in the newborn rat. *Behavioral Neuroscience*, 114, 484-495. DOI: 10.1037//0735-7044.114.3.484.
- Cooper, S.J. & Ridley, E.T. (2005). Abecarnil and palatability: Taste reactivity in normal ingestion in male rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 81, 517 – 523. DOI: 10.1016/j.pbb.2005.02.014.
- Crespi, L. P. (1942). Quantitative variation in incentive and performance in the white rat. *American Journal of Psychology*, 55, 467-517. DOI: 10.2307/1417120.

- Cromwell, H.C. & Berridge, K.C. (1993) Where does damage lead to enhanced food aversion: the ventral pallidum/substantia innominata or lateral hypothalamus? *Brain Research*, 624, 1-10. DOI: 10.1016/0006-8993(93)90053-P.
- Crook, C. K. (1978). Taste perception in the newborn infant. *Infant Behavior and Development*, 1, 52-69. DOI: 10.1016/S0163-6383(78)80009-5.
- Crook, C. K., & Lipsitt, L. P. (1976). Neonatal nutritive sucking: effects of taste stimulation upon sucking rhythm and heart. *Child Development*, 47, 518-52. DOI: 10.2307/1128812.
- Crystal, S.R. & Bernstein, I.L. (1998). Infant Salt Preference and Mother's Morning Sickness. *Appetite*, 30, 297–307. DOI: 10.1006/appe.1997.0144.
- Cuenya, L., Mustaca, A & Kamenetzky, G. (2015). Postweaning isolation affect responses to incentive contrast in adulthood. *Developmental Psychobiology*, 57, 177-188. DOI: 10.1002/dev.21273.
- Cuenya, L., Serafini, M, Mustaca, A & Kamenetzky, G. (2015). Efecto del haloperidol sobre el contraste sucesivo positivo consumatorio en ratas adultas con aislamiento adolescente. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*, 7, 30-37. ISSN 1852-4206.
- Dailey, W., Linder, M. & Amsel, A. (1983). The partial-reinforcement extinction effect in 4-5-day-old guinea pigs. *Animal Learning & Behavior*, 11, 337-340. DOI: 10.3758/BF03199785.
- Daly, H.B. (1974). Reinforcing properties of escape from frustration aroused in various learning situations. *Psychology of Learning and Motivation*, 8, 187–231. DOI: 10.1016/S0079-7421(08)60455-7.
- Daniel, A.M., Ortega, L.A. & Papini, M.R. (2009). Role of the opioid system in incentive downshift situations. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92, 439–450. DOI: 10.1016/j.nlm.2009.06.003.
- Desor, J. A., Maller, O., & Turner, R. E. (1973). Taste in acceptance of sugars by human infants. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 84, 496-501. DOI: 10.1037/h0034906.

- Dias, B.G. & Ressler, K.J. (2014). Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nature Neuroscience*, *17*, 89-96. DOI: 10.1038/nn.3594.
- Díaz-Cenzano, E. & Chotro, M.G. (2010a). Prenatal Binge Ethanol Exposure on Gestation Days 19–20, but not on Days 17–18, Increases Postnatal Ethanol Acceptance in Rats. *Behavioral Neuroscience*, *124*, 362–369. DOI: 10.1037/a0019482.
- Díaz-Cenzano, E. & Chotro, M.G. (2010b). The Effect of Taste Familiarity on Intake and Taste Reactivity in Infant Rats. *Developmental Psychobiology*, *52*, 109–120. DOI: 10.1002/dev.20418.
- Domínguez, H. D, López M. F. & Molina, J. C. (1998). Neonatal responsiveness to alcohol odor and infant alcohol intake as a function of alcohol experience during late gestation. *Alcohol*, *16*, 109-117. DOI: 10.1016/S0741-8329(97)00169-9.
- Engen, T., & Lipsitt, L. P. (1974). Ability of Newborn Infants to Discriminate Sapid Substances. *Developmental Psychology*, *10*, 741-744. DOI: 10.1037/h0037005.
- Estes, W. K. (1950). Toward a statistical theory of learning. *Psychological Review*, *57*, 94-107. DOI: 10.1037/0033-295X.101.2.282.
- Estudios en Ontogenia. (2017, Enero, 25). Test de Reactividad al Sabor en ratas infantas. [Archivo de video]. Recuperado de https://www.youtube.com/watch?v=7Zp-MKWxN_c.
- Estudios en Ontogenia. (2017, Enero, 25). Test quinina + limón. [Archivo de video]. Recuperado de <https://www.youtube.com/watch?v=nHp4oK6RWCw>.
- Faas, A.E., March, S.M., Moya, P.R. & Molina, J.C. (2015). Alcohol odor elicits appetitive facial expressions in human neonates prenatally exposed to the drug. *Physiology & Behavior*, *148*, 78–86. DOI: 10.1016/j.physbeh.2015.02.031.

- Flaherty, C.F. (1982). Incentive contrast: A review of behavioral changes following shift in reward. *Animal Learning & Behavior*, 10, 409-440. DOI: DOI: 10.3758/BF03212282.
- Flaherty, C.F. (1990). Effect of anxiolytics and antidepressants on extinction and negative contrast. *Pharmacology & Therapeutics*, 46, 309-320. DOI: 10.1016/0163-7258(90)90097-L.
- Flaherty, C.F. (1996). *Incentive relativity*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Flaherty, C.F., Becker, H.C. & Checke, S. (1983). Repeated successive contrast in consummatory behavior with repeated shifts in sucrose concentration. *Animal Learning & Behavior*, 11, 407-414. DOI: 10.3758/BF03199795.
- 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 & Behavior*, 13, 309-314. DOI: DOI: 10.3758/BF03200025.
- Flaherty, C. F., Blitzer, R. & Collier, G., H. (1978). Open field behaviors elicited by reward reduction. *American Journal of Psychology*, 91, 429-443. DOI: 10.2307/1421690.
- 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, 1-9. DOI: 10.1016/S0166-4328(97)00138-1.
- Flaherty, C. F. & Hamilton, L. W. (1971). Responsivity to decreasing sucrose concentration following septal lesions in the rat. *Physiology and Behavior*, 11, 625- 631. DOI: 10.1016/0031-9384(71)90179-X.
- Flaherty, C.F., Otto, T., Hsu, D. & Coppotelli, C. (1995). Lesions of the hippocampus or entorhinal cortex differentially influence instrumental and consummatory behavior. Publicación presentada en el "Eastern Psychological Association". Boston.

- Flaherty, C.F., Powell, G. y Hamilton, L.W. (1979). Septal lesion, sex, and incentive shifts effects on open field behavior of rats. *Physiology and Behavior*, 22, 903-909. DOI: 10.1016/0031-9384(79)90335-4.
- Flaherty, C.F., Rowan, G.A., Emerich, D. y Walsh, T. (1989). Effects of intra-hippocampal administration of colchicine on incentive contrast and on radial maze performance. *Behavioral Neuroscience*, 103, 319-328. DOI: 10.1037/0735-7044.103.2.319.
- Flynn, F.W., Grill, H.J., Schulkin, J. & Norgren, R. (1991). Central Gustatory Lesions: II. Effects on Sodium Appetite, Taste Aversion Learning, and Feeding Behaviors. *Behavioral Neuroscience*, 105, 944-954. DOI: 10.1037/0735-7044.105.6.944.
- Freidin, E. & Mustaca, A. (2004). Frustration and sexual behavior in male rats. *Learning & Behavior*, 32, 311-320. DOI: 10.3758/BF03196030.
- Freidin E., Kamenetzky G. & Mustaca A. (2005). Anxiolytic-like effect of ejaculation upon frustration. *Learning & Behavior*, 33, 277-286. DOI: 10.3758/BF03192857.
- Garcia, J. & Koelling, R.A. (1966). Relation of cue to consequence in avoidance learning. *Psychonomic Science*, 4, 123-124. DOI: 10.3758/BF03342209.
- Ganchrow, J., Steiner, J. & Daher, M. (1983). Neonatal Response to Intensities Facial Expressions in Different Qualities and of Gustatory Stimuli. *Infant Behavior and Development*, 6, 189-200. DOI: 10.1016/S0163-6383(83)90301-6.
- Gavalerna, O.G., Seeley, R.J., Berridge, K.C., Grill, H.J., Epstein, A.N. & Schulkin, J. (1993). Lesions of the central nucleus of the amygdala I: effects on taste reactivity, taste aversion learning and sodium appetite. *Behavioural Brain Research*, 59, 11-17. DOI: 10.1016/0166-4328(93)90146-H.
- Gemberling, G. A., & Domjan, M. (1982). Selective associations in one-day-old rats: taste-toxicosis and texture-shock aversion learning. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, 96, 105-113. DOI: 10.1037/h0077855.

- Gemberling, G.A., Domjan, M. & Amsel, A. (1980). Aversion Learning in 5-Day-Old Rats: Taste-Toxicosis and Texture-Shock Associations. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *94*, 734-745. DOI: 10.1037/h0077706.
- Grant, V.L., McDonald, S.V., Sheppard, R.C., Caldwell, C.L., Heeley, T.H., Brown, A.R. & Martin, G.M. (2012). Dissociation of conditioned taste avoidance from conditioned disgust reactions induced by wheel running in rats. *Behavioural Processes*, *90*, 223-228. DOI: 10.1016/j.beproc.2012.01.011.
- Gray, J.A. (1987). *The psychology of fear and stress*. Cambridge University Press.
- Gray, J.A. & McNaughton, N. (2000). *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System (2 ed.)*. (Oxford Psychology Series No. 33). Oxford: Oxford University Press.
- Gregg, B., Kittrell, E.M., Domjan, M. & Amsel, A. (1978). Ingestional Aversion Learning in Prewanling Rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *92*, 785-795. DOI: 10.1037/h0077543.
- Grigson, P. S., Spector, A. C. y Norgren, R. (1994). Lesions of the pontine parabrachial nuclei eliminate successive negative contrast effects in rats. *Behavioral Neuroscience*, *108*, 714-723. DOI: 10.1037//0735-7044.108.4.714.
- Grill, H.J. & Norgren, R. (1978a). The taste reactivity test. I. mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats, *Brain Research*, *143*, 263-279. DOI: 10.1016/0006-8993(78)90568-1.
- Grill, H.J. & Norgren, R. (1978b). The taste reactivity test. II. Mimetic responses to gustatory stimuli in chronic thalamic and chronic decerebrate rats. *Brain Research*, *143*, 281-297. DOI: 10.1016/0006-8993(78)90569-3.
- Hall, W.G. & Bryan, T.E. (1981). The Ontogeny of Feeding in Rats: IV. Taste Development as Measured by Intake and Behavioral Responses to Oral Infusions of Sucrose and Quinine. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *95*, 240-251. DOI: 10.1037/h0077771.

- Hall, W.G., Cramer, C.P & Blass, E.M. (1977). Ontogeny of Suckling in Rats: Transitions Toward Adult Ingestion. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *91*, 1141-1155. DOI: 10.1037/h0077388.
- Hannigan, J.H., Chiodo, L.M., Sokol, R.J., Janisse, J. & Delaney-Black, V. (2015). Prenatal alcohol exposure selectively enhances young adult perceived pleasantness of alcohol odors. *Physiology & Behavior*, *148*, 71–77. DOI: 10.1016/j.physbeh.2015.01.019.
- Hanson, M., Jojola, S.M., Rawson, N.E., Crowe, M. & Laska, M. (2016). Facial expressions and other behavioral responses to pleasant and unpleasant tastes in cats (*Felis silvestris catus*). *Applied Animal Behaviour Science*, *181*, 129–136. DOI: 10.1016/j.applanim.2016.05.031.
- Hill, D. L., Bradley, R. M. & Mistretta, C. M. (1983). Development of taste responses in rat nucleus of solitary tract. *Journal of Neurophysiology*, *50*, 879 – 894. PMID: 6631468.
- Ho, Y. & Berridge, K. (2014). Excessive disgust caused by brain lesions or temporary inactivations: Mapping hotspots of nucleus accumbens and ventral pallidum. *European Journal of Neuroscience*, *40*, 3556–3572. DOI: 10.1111/ejn.12720.
- Hoffman, H., Hunt, P. & Spear, N.E. (1991). Ontogenetic Differences in CS Palatability following Conditioned Taste Aversion Training. *Learning and Motivation*, *22*, 329-352. DOI: 10.1016/0023-9690(91)90012-W.
- Holson, R.R. & Pearce, B. (1992). Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicology and Teratology*, *14*, 221-228. DOI: 10.1016/0892-0362(92)90020-B.
- Hull, C. L. (1943). *Principles of Behavior*. Appleton, New York.
- Ifrán, M.C., Suárez, A.B. & Kamenetzky, G.V. (2014). Aprendizajes sensoriales tempranos y su relación con las conductas de apego. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*, *6*, 50-60.
- Itoga, C.A., Berridge, K.C. & Aldridge, J.W. (2016). Ventral pallidal coding of a learned taste aversion. *Behavioural Brain Research*, *300*, 175–183. DOI: 10.1016/j.bbr.2015.11.024.

- Jankunis, E.S. & Whishaw, I.Q. (2013). Sucrose Bobs and Quinine Gapes: Horse (*Equus caballus*) responses to taste support phylogenetic similarity in taste reactivity. *Behavioural Brain Research*, 256, 284– 290. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.08.024.
- Jiang, T., Soussignan, R., Schaal, B. & Royet, J. (2015). Reward for food odors: an fMRI study of liking and wanting as a function of metabolic state and BMI. *Scan*, 10, 561-568. DOI: 10.1093/scan/nsu086.
- Justel, N., Ruetti, E., Mustaca, A. E., & Papini, M. R. (2012). Effects of pretraining treatment with testosterone on successive and anticipatory negative contrast. *Physiology & Behavior*, 105, 933-937. DOI: 10.1016/j.physbeh.2011.11.012.
- Justel, N., Pautassi, R.M. & Mustaca, A.E. (2014). Proactive interference of open field on consummatory successive negative contrast Proactive interference of open field on consummatory successive negative contrast. *Learning & Behavior*, 42, 58–68. DOI: 10.3758/s13420-013-0124-8.
- Kamenetzky, G.V. (2008). *Etanol y omisión sorpresiva del reforzador* (Tesis doctoral). Facultad de Psicología – Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Kawasaki, K. & Iwasaki, T. (1997). Corticosterone levels during extinction of runway response in rats. *Life Sciences*, 61, 1721-1728. DOI: 10.1016/S0024-3205(97)00778-9.
- Kiefer, S.W., Bice, P.J., Orr, M.R. & Dopp, J.M. (1990). Similarity of Taste Reactivity Responses to Alcohol and Sucrose Mixtures in Rats. *Alcohol*, 7, 115-120. DOI: 10.1016/0741-8329(90)90071-J.
- Kiefer, S.W., Hill, K.G., Coonfield, D.L., & Ferraro, F.A. (2005). Ethanol familiarity and naltrexone treatment affect ethanol responses in rats. *Alcohol*, 37, 167-172. DOI: 10.1016/j.alcohol.2006.03.004.
- Kiefer S.W., Hill K.G. & Kaczmarek, H.J. (1998). Taste reactivity to alcohol and basic tastes in outbred mice. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, 22, 1146-51. DOI: 10.1111/j.1530-0277.1998.tb03714.x.

- Kobre, K.R., & Lipsitt, L.P. (1972). A Negative Contrast Effect in New-borns. *Journal of Experimental Child Psychology*, 14, 81-91. DOI: 10.1016/0022-0965(72)90033-1.
- Kozlov, A.P., Petrov, E.S., Varlinskaya, E.I., & Spear, N.E. (2006). Taste differentiation in the context of suckling and independent, adultlike ingestive behavior. *Developmental Psychobiology*, 48, 133-145. DOI: 10.1002/dev.20123.
- Landers, M. S. & Sullivan, R. M. (2012). The development and neurobiology of infant attachment and fear. *Developmental Neuroscience*, 34, 101–114. DOI: 10.1159/000336732.
- Larson, N.I., Neumark-Sztainer, D., Peter J. Hannan, P.J. & Story, M. (2007). Trends in Adolescent Fruit and Vegetable Consumption, 1999–2004: Project EAT. *American Journal of Preventive Medicine*, 32, 147–150. DOI: 10.1016/j.amepre.2006.10.011.
- Letz, R., Burdette, D.R., Gregg, B., Kittrell, E.M. & Amsel, A. (1978). Evidence for a Transitional Period for Development of Persistence in Infant Rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 92, 856-866. DOI: 10.1037/h0077527.
- Levine, S. (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic pituitary adrenal axis in the rat. *Physiology & Behavior*, 73, 255-260. DOI: 10.1016/S0031-9384(01)00496-6.
- 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, 953-960. DOI: 10.1016/S0091-3057(03)00023-6.
- Liem, D.G. & Mennella, J.A. (2002). Sweet and sour preferences during childhood: role of early experiences. *Developmental Psychobiology*, 41, 388-395. DOI: 10.1002/dev.10067.
- Limebeer, C.L. & Parker, L.A. (2000). The Antiemetic Drug Ondansetron Interferes With Lithium-Induced Conditioned Rejection Reactions, But Not Lithium-Induced Taste Avoidance in Rats. *Journal of Experimental*

Psychology: Animal Behavior Processes, 26, 371-384. DOI:
10.1037//0097-7403.26.4.371.

Lipchock, S. V., Reed, D. R. & Mennella, J. A. (2011). The gustatory and olfactory systems during infancy: Implications of development of feeding behaviors in the high risk neonate. *Clinics in Perinatology*, 38, 627-641. DOI: 10.1016/j.clp.2011.08.008.

Lobaugh, N.J., Bootin, M. & Amsel, A. (1985). Sparing of Patterned Alternation but Not Partial Reinforcement Effect After Infant and Adult Hippocampal Lesions in the Rat. *Behavioral Neuroscience*, 99, 46-59. DOI: 10.1037//0735-7044.99.1.46.

Lopez Seal, M.F., Cuenya, L., Suárez, 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. DOI: 10.1016/j.beproc.2013.05.004.

Lopez Seal, F., Pellegrini, S. & Mustaca, A.E. (2010). Respuestas de elección durante el contraste negativo sucesivo consumatorio en ratas. *Avances en Psicología Latinoamericana*, 28, 219-225. ISSN: 1794-4724

Maldonado, A., Cándido, A., Morales, A. & Torres, C. (2006). Diazepam attenuates Successive Positive Contrast in One-Way Avoidance Learning. *International Journal of Psychology and Psychological Therapy*, 6, 249-260. ISSN: 1577-7057.

Maldonado, A., Torres, C., Escarabajal, M.D., Cándido, A., De la Torre, L., Gómez, M.J., Tobeña, A. & Fernández-Teruel, A. (2007). Successive positive contrast in one-way avoidance behavior with Roman low-avoidance rats. *Physiology & Behavior*, 90, 803–808. DOI: 10.1016/j.physbeh.2007.01.009.

Mast, V.K., Fagen, J.W., Rovee-Collier, C.K., & Sullivan, M.W. (1980). Immediate and long-term memory for reinforcement context: The development of learned expectancies in early infancy. *Child Development*, 51, 700-707. DOI: 10.2307/1129455.

- Maxwell, F.R., Calef, R.S., Murray, D.W., Shepart, F.C., & Norville, R.A. (1976). Positive and negative contrast following multiple shifts in reward magnitude under high drive and immediate reinforcement. *Animal Learning & Behavior*, *4*, 480–448. DOI: 10.3758/BF03214443.
- Mellgren, R.L. (1971). Positive contrast in the rat as a function of number of preshift trials in the runway. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *77*, 329–333. DOI: 10.1037/h0031666.
- Mellgren, R.L. (1972). Positive and negative contrast effects using delayed reinforcement. *Learning & Motivation*, *3*, 185-193. DOI: 10.1016/0023-9690(72)90038-0.
- Mennella, J.A. & Beauchamp, G.K. (1991). The transfer of alcohol to human milk. Effects on flavor and the infant's behavior. *New England Journal of Medicine*, *352*, 981–985. DOI: 10.1056/NEJM199110033251401.
- Mennella, J.A. & Beauchamp, G.K. (1993). Effects of beer on breast-fed infants. *JAMA*, *269*, 1637–1638. DOI: 10.1001/jama.1993.03500130051027.
- Mennella, J. A. & Beauchamp, G. K. (1996a). The human infant's response to vanilla flavors in mother's milk and formula. *Infant Behavior and development*, *19*, 13-19. DOI: 10.1016/S0163-6383(96)90040-5.
- Mennella, J.A. & Beauchamps, G.K. (1996b). Developmental change in the acceptance of protein hydrolyzate formula. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*, *17*, 386-391. DOI: 10.1097/00004703-199612000-00003.
- Mennella, J.A. & Beauchamp, G.K. (1997). Infants' suckling responses to the flavor of alcohol in mothers' milk. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *21*, 581–585. DOI: 10.1111/j.1530-0277.1997.tb03806.x.
- Mennella J.A. & Beauchamp G.K. (1998a). Development and bad taste. *Pediatric Asthma, Allergy & Immunology*, *12*, 161–163. DOI: 10.1089/pai.1998.12.161.
- Mennella, J.A. & Beauchamp, G.K. (1998b). Infants' exploration of scented toys: effects of prior experiences, *Chemical Senses*, *23*, 11–17. DOI: 10.1093/chemse/23.1.11.

- Mennella, J.A. & Beauchamps, G.K. (2002). Flavor experiences during formula feeding are related to preferences during childhood. *Early Human Development*, *68*, 71–82. DOI: 10.1016/S0378-3782(02)00008-7.
- Mennella, J. A. & Beauchamp, G. K. (2008). Optimizing Oral Medications for Children. *Clinical Therapeutics*, *30*, 2120-2132. DOI: 10.1016/j.clinthera.2008.11.018.
- Mennella, J.A. & Forestell, C.A. (2008). Children's hedonic responses to the odors of alcoholic beverages: A window to emotions. *Alcohol*, *42*, 249-260. DOI: 10.1016/j.alcohol.2008.03.129.
- Mennella, J.A. & García, P.L. (2000). Children's Hedonic Response to the Smell of Alcohol: Effects of Parental Drinking Habits. *Alcoholism: clinical and experimental research*, *24*, 1167–1171. DOI: 10.1097/00000374-200008000-00005.
- Mennella, J.A., Griffin, C.A. & Beauchamp, G.K. (2004). Flavor Programming During Infancy. *Pediatric*, *113*, 840-845. DOI: 10.1542/peds.113.4.840.
- Mennella, J.A., Jagnow, C.P. & Beauchamp, G.K. (2001). Prenatal and Postnatal Flavor Learning by Human Infants. *Pediatric*, *107*, 1-6. DOI: 10.1542/peds.107.6.e88.
- Mennella, J. A., Lukasewycz, L. D., Castor, S. M. & Beauchamp, G. K. (2011). The timing and duration of a sensitive period in human flavor learning: a randomized trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *93*, 1019-1024. DOI: 10.3945/ajcn.110.003541.
- Mickley, G. A., Remmers-Roeber, D. R., Crouse, C., & Peluso, R. (2000). Ketamine blocks a taste-mediated conditioned motor response in perinatal rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *66*, 547-552. DOI: 10.1016/S0091-3057(00)00250-1.
- Miller, S. S. & Spear, N. E. (2008). Olfactory learning in the rat neonate soon after birth. *Developmental Psychobiology*, *50*, 554-565. DOI: 10.1002/dev.20318.

- Miller, S. S. & Spear, N. E. (2009). Olfactory learning in the rat immediately after birth: Unique salience of first odors. *Developmental Psychobiology*, *51*, 488-504. DOI: 10.1002/dev.20388.
- Miller, S. S. & Spear, N. E. (2010). Mere odor exposure learning in the rat neonate immediately after birth and 1 day later. *Developmental Psychobiology*, *52*, 343-351. DOI: 10.1002/dev.20456.
- Mitchell, C. & Flaherty, C. (1998). Temporal Dynamics of Corticosterone Elevation in Successive Negative Contrast. *Physiology & Behavior*, *64*, 297-292. DOI: 10.1016/S0031-9384(98)00072-9.
- Molina, J. C., & Chotro, M. G. (1991). Association between chemosensory stimuli and cesarean delivery in rat fetuses: neonatal presentation of similar stimuli increases motor activity. *Behavioral and Neural Biology*, *55*, 42 – 60. DOI: 10.1016/0163-1047(91)80126-Y.
- Molina, J. C. & Spear, N. E. (2001). Consequences of early exposure to alcohol: How animal studies reveal later patterns of use and abuse in humans. En M. E. Carroll y J. B. Overmier. *Animals Research and Human Health*, 79-85.
- Moriceau, S., Roth, T. L., Okotoghaide, T. & Sullivan, R. M. (2004). Corticosterone controls the developmental emergence of fear and amygdala function to predator odors in infant rat pups. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *22*, 415–422. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2004.05.011.
- Moriceau, S. & Sullivan, R. M. (2005). Neurobiology of infant attachment. *Developmental Psychobiology*, *47*, 230–242. DOI: 10.1002/dev.20093.
- Mustaca, A. E. (1999). Respuestas rápidas bifásicas inmunológicas por frustración y euforia. *Revista Latinoamericana de Psicología*, *31*, 90-110.
- Mustaca, A. E., Bentosela, M., Ruetti, E., Kamenetzky, G., Cuenya, L., Justel, N. et al. (2009). Similitudes y discrepancias en dos modelos animales de frustración. En: *Recientes desarrollos iberoamericanos en investigación en Ciencias del Comportamiento*. Ed. CIIPME-CONICET. Tomo II, 921-940.

- Mustaca, A. E. & Martinez, C. (2000). Respuestas agonísticas en ratas sometidas a frustración. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 32, 485-504.
- Mustaca, A. E. & Papini, M. (2005). Consummatory successive negative contrast induces hypoalgesia. *International Journal of Comparative Psychology*, 18, 333-339.
- Nagy, B., Takács, G., Szabó, I., Lénárd, L. & Karádi, Z. (2012). Taste reactivity alterations after streptozotocin microinjection into the mediodorsal prefrontal cortex. *Behavioural Brain Research*, 234, 228–232. DOI: 10.1016/j.bbr.2012.06.029.
- Nowlis, G.H. & Kessen, W. (1976). Human newborns differentiate differing concentrations of sucrose and glucose. *Science*, 191, 865-866. DOI: 10.1126/science.1251200.
- Nizhnikov, M. E., Petrov, E. S., Varlinskaya, E. I. & Spear N. E. (2002). Newborn Rats' First Suckling Experience: Taste Differentiation and Suckling Plasticity. *Physiology & Behavior*, 76, 181– 198. DOI: 10.1016/S0031-9384(01)00672-2.
- Ortega, L.A., Daniel, A.D., Davis, J.B., Fuchs, P.N. & Papini, M.R. (2011). Peripheral pain enhances the effects of incentive downshifts. *Learning and Motivation*, 42, 203–209. DOI: 10.1016/j.lmot.2011.03.003.
- 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. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.01.029.
- 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*, 6, 988-995. DOI: 10.1037/a0025769.
- Papini, M.R. & Dudley, R.T. (1997). Consequences of surprising reward omissions. *Review of General Psychology*, 3, 275-285. DOI: 10.1037/1089-2680.1.2.175.

- Papini, M.R., Fuchs, P.N., & Torres, C. (2015). Behavioral neuroscience of psychological pain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *48*, 53–69. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2014.11.012.
- Papini, M.R. & Pellegrini, S. (2006). Scaling relative incentive value in consummatory behavior. *Learning and Motivation*, *37*, 357-378. DOI: 10.1016/j.lmot.2006.01.001.
- Parker, L.A. (1995). Rewarding drugs produce taste avoidance, but not taste aversion. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *19*, 143-151. DOI: 10.1016/0149-7634(94)00028-Y.
- Parker, L.A. & Leeb, K. (1994). Amphetamine-Induced modification of Quinine Palatability: Analysis by the Taste Reactivity Test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *47*, 413-420. DOI: 10.1016/0091-3057(94)90137-6.
- Parker, L.A. & MacLeod, K.B. (1991). Chin Rub CRs May Reflect Conditioned Sickness Elicited by a Lithium-Paired Sucrose Solution. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, *40*, 983-986. DOI: 10.1016/0091-3057(91)90115-I.
- Parker, L.A., Rana, S.A. & Limebeer, C.L. (2008). Conditioned Nausea in Rats: Assessment by Conditioned Disgust Reactions, Rather Than Conditioned Taste Avoidance. *Canadian Journal of Experimental Psychology*, *62*, 198–209. DOI: 10.1037/a0012531.
- Pautassi, R.M., Arias, C., Molina, J.C. & Spear, N.E. (2008). Domperidone Interferes with Conditioned Disgust Reactions but Not Taste Avoidance Evoked by a LiCl-Paired Taste in Infant Rats. *Developmental Psychobiology*, *50*, 343–352. DOI: 10.1002/dev.20288.
- Pautassi R. M., Melloni C., Ponce L. F., & Molina J. C. (2005). Acute ethanol counteracts the acquisition of an aversive olfactory learning in infant rats. *Alcohol: an International Biomedical Journal*, *36*, 2,99-105. DOI: 10.1016/j.alcohol.2005.07.005.
- Pautassi, R.M., Nizhnikov, M.E. & Spear, N.E. (2009). Assessing appetitive, aversive, and negative ethanol-mediated reinforcement through an

- immature rat model. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33, 953-974. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2009.03.008.
- Pautassi R. M., Nizhnikov M. E., Spear N. E. (2012). Ethanol-mediated appetitive conditioning in infant rats, but not corticosterone release, is dependent on route of ethanol administration. *Developmental Psychobiology*, 54, 98-104. DOI: 10.1002/dev.20567.
- Peciña, S. & Berridge, K.C. (2005). Hedonic Hot Spot in Nucleus Accumbens Shell: Where Do μ -Opioids Cause Increased Hedonic Impact of Sweetness? *The Journal of Neuroscience*, 25, 11777–11786. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4458-13.2014.
- Pecoraro, N. & Dallman, M. F. (2005). c-Fos After Incentive Shifts: Expectancy, Incredulity, and Recovery. *Behavioral Neuroscience*, 119, 366-387. DOI: 10.1037/0735-7044.119.2.366.
- 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 & Behavior*, 96, 651-661. DOI: 10.1016/j.physbeh.2008.12.018.
- Pedersen, P. E., Williams, C. L. & Blass, E. M. (1982). Activation and odor conditioning of suckling behavior in 3-day-old albino rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 8, 329-341. DOI: 10.1037/0097-7403.8.4.329.
- Pellegrini, S. & Mustaca, A. E. (2000). Consummatory successive negative contrast with solid food. *Learning & Motivation*, 31, 200-209. DOI: 10.1006/lmot.2000.1052.
- Pellegrini, S., Wood, M., Daniel, A.M. & Papini, M.R. (2005). Opioid receptors modulate recovery from consummatory successive negative contrast. *Behavioural Brain Research*, 164, 239–249. DOI: 10.1016/j.bbr.2005.06.035.
- Petrov, E. S., Varlinskaya, E. I. & Smotherman, W. P. (1997). The newborn rat ingests fluids through a surrogate nipple: A new technique for the study

of early suckling behavior. *Physiology & Behavior*, 62, 1155–1158. DOI: 10.1016/S0031-9384(97)00310-7.

Petrov, E. S., Nizhnikov, M. E., Kozlov, A. P., Varlinskaya, E. I., Kramskaya, T. A. & Spear, N. E. (2004). Repetitive exposures to a surrogate nipple providing nutritive and non-nutritive fluids: effects on suckling behavior of the newborn rat. *Appetite*, 43, 185-194. DOI: 10.1016/j.appet.2004.04.005.

Psyrdellis, M., Pautassi, R.M. & Justel, N. (2016). Open field exposure facilitates recovery from an aversive emotional event: Involvement of adrenergic and cholinergic transmitter systems. *Neuroscience Letter*, 633, 202-209. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.09.015.

Psyrdellis, M., Pautassi, R.M., Mustaca, A.E. & Justel, N. (2016). Cholinergic transmission underlies modulation of frustration by open field exposure. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 140, 8-16. DOI: 10.1016/j.pbb.2015.10.017.

Purgert, R.J., Wheeler, D.S., McDannald, M.A. & Holland, P.C. (2012). Role of Amygdala Central Nucleus in Aversive Learning Produced by Shock or by Unexpected Omission of Food. *The Journal of Neuroscience*, 32, 2461-2472. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5090-11.2012.

Rana, S.A. & Parker, L.A. (2008). Differential effects of neurotoxin-induced lesions of the basolateral amygdala and central nucleus of the amygdala on lithium-induced conditioned disgust reactions and conditioned taste avoidance. *Behavioural Brain Research*, 189, 284–297. DOI: 10.1016/j.bbr.2008.01.005.

Reilly, S. & Trifunovic, R. (2003). Gustatory thalamus lesions eliminate successive negative contrast in rats: Evidence against a memory deficit. *Behavioral Neuroscience*, 117, 606-615. DOI: 10.1037/0735-7044.117.3.606.

Rescorla, R. A. & Wagner, A. R. (1972). A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. In

“*Classical Conditioning II: Current Research and Theory*” (A. H. Black and W. F. Prokasy, eds.), pp 64-99. Appleton, New York.

- Reynolds, S. & Berridge, K.C. (2002). Positive and Negative Motivation in Nucleus Accumbens Shell: Bivalent Rostrocaudal Gradients for GABA-Elicited Eating, Taste “Liking”/“Disliking” Reactions, Place Preference/Avoidance, and Fear. *The Journal of Neuroscience*, 22, 7308–7320. DOI: 20026734.
- Richardson, D.K., Reynolds, S.M., Cooper, S.J. & Berridge, K.C. (2005). Endogenous opioids are necessary for benzodiazepine palatability enhancement: Naltrexone blocks diazepam-induced increase of sucrose-liking. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 81, 657 – 663. DOI: 10.1016/j.pbb.2005.05.006.
- Rosen, A.J. & Tessel, R.E. (1970). Chlorpromazine, chlordiazepoxide and incentive shift performance in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 72, 257-262. DOI: 10.1037/h0029467.
- Rosenstein, D. & Oster, H. (1988). Differential Facial Responses to Four Basic Tastes in Newborns. *Child Development*, 59, 1555-1568. DOI: 10.2307/1130670.
- Rovee-Collier, C. (1999). The development of infant memory. *Psychological Science*, 8, 80–85. DOI: 10.1111/1467-8721.00019.
- Rowan, G.A. & Flaherty, C.F. (1987). The effect of morphine on negative contrast in consummatory behavior. *Psychopharmacology*, 93, 51-58. DOI: 10.1007/BF02439586.
- Salinas, J.A., & White, N.M. (1998). Contributions of the Hippocampus, Amygdala, and Dorsal Striatum to the Response Elicited by Reward Reduction. *Behavioral Neuroscience*, 112, 812-826. DOI: 10.1037/0735-7044.112.4.812.
- 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, 34-40. DOI: 10.1016/j.bbr.2006.01.026.

- Scott, J.A., Chih, T.Y. & Oddy, W.H. (2012). Food variety at 2 years of age is related to duration of breastfeeding. *Nutrients*, *4*, 1464-1474. PMID: 12081821.
- Schaal, B., Marlier, L. & Soussignan, R. (2000). Human fetuses learn odors from their pregnant mother's diet. *Chemical Senses*, *25*, 729-737. DOI: 10.1093/chemse/25.6.729.
- Schwartz, G.J. & Grill, H.J. (1985). Comparing Taste-elicited Behaviors in Adult and Neonatal Rats. *Appetitive*, *6*, 373-386. DOI: 10.1016/S0195-6663(85)80005-2.
- Shah, A., Oxley, G., Lovic, V & Fleming, A.S. (2001). Effects of Prewearing Exposure to Novel Maternal Odors on Maternal Responsiveness and Selectivity in Adulthood. *Developmental Psychobiology*, *41*, 187–196. DOI: 10.1002/dev.10064.
- Shanab, M.E., Sanders, R. & Premack, D. (1969). Positive contrast in the runway obtained with delay of reward. *Science*, *164*, 724-725. DOI: 10.1126/science.164.3880.724.
- Smith, K.S. & Berridge, K.C. (2005). The Ventral Pallidum and Hedonic Reward: Neurochemical Maps of Sucrose "Liking" and Food Intake. *The Journal of Neuroscience*, *25*, 8637– 8649. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1902-05.2005.
- Spear, L. P., Specht, S. M., Kirstein, C. L., & Kuhn, C. M. (1989). Anterior and posterior, but not cheek, intraoral cannulation procedures elevate serum corticosterone levels in neonatal rat pups. *Developmental Psychobiology*, *22*, 401–411. DOI: 10.1002/dev.420220407.
- Stanton, M. & Amsel, A. (1980). Adjustment to Reward Reduction (but No Negative Contrast) in Rats 11, 14, and 16 Days of Age. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *94*, 446-458. DOI: 10.1037/h0077676.
- Stanton, M., Dailey, W. & Amsel, A. (1980). Patterned (Single) Alternation in 11- and 14-Day-Old Rats Under Various Reward Conditions. *Journal of*

- Comparative and Physiological Psychology*, 94, 469-471. DOI: 10.1037/h0077675.
- Stanton, M., Lobaugh, N. & Amsel, A. (1984). Age of First Appearance of Simultaneous and Successive Negative Contrast in Infant Rats. *Animal Behavior Processes*, 10, 376-389. DOI: 10.1037/0097-7403.10.3.376.
- Steckler, T., Saugal, A., Aggleton, J.P. & Drinkenburg, W.U.I.M. (1998). Recognition memory in rats III. Neurochemical substrates. *Progress in Neurobiology*, 54, 333-348. DOI: 10.1016/S0301-0082(97)00062-2.
- Steiner, J.E. (1974). Discussion paper: innate, discriminative human facial expressions to taste and smell stimulation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 237, 229–233. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1974.tb49858.x.
- Steiner, J.E. & Glaser, D. (1984) Differential Behavioral Responses to Taste Stimuli in Non-human Primates. *Journal of Human Evolution*, 13, 709-723. DOI: 10.1016/S0047-2484(84)80021-4.
- Steiner, J.E., Glaser, D., Hawilo, M.E. & Berridge, K.C. (2001). Comparative expression of hedonic impact: affective reactions to taste by human infants and other primates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25, 53-74. DOI: 10.1016/S0149-7634(00)00051-8.
- Stickrod, G., Kimble, D.P. & Smotherman, W.P. (1982). In utero taste/odor aversion conditioning in the rat. *Physiology & Behavior*, 28, 5 - 7. DOI: 10.1016/0031-9384(82)90093-2.
- Sullivan, R. M. (2003). *Developing a sense of safety*. Neurobiology of neonatal attachment. En: King, J., Ferris, C., and Lederhendler, I. (Eds.), *Roots of Mental Illness in Children*. New York Academy of Science, 1008, pp 122-132.
- Sullivan, R.M., Landers, M., Ycaman, B. & Wilson, D.A. (2000). Good memories of bad events in infancy. *Nature*, 407, 38-39. DOI:10.1038/35024156
- Thorndike, E. L. (1898). Animal intelligence: An experimental study of the associative processes in animals. *Psychological Review Monographs Supplements*, 2, 1-8. DOI: 10.1037/h0067373.

- Thorndike, E. L. (1911). *Animal intelligence*. Macmillan, New York.
- Tindell, A.J., Berridge, K.C., Zhang J., Peciña, S. & Aldridge, J.W. (2005). Ventral pallidal neurons code incentive motivation: amplification by mesolimbic sensitization and amphetamine. *European Journal of Neuroscience*, 22, 2617-2634. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.04411.x.
- Tindell, A.J., Smith, K.S., Peciña, S., Berridge, K.C. & Aldridge, J.W. (2006). Ventral Pallidum Firing Codes Hedonic Reward: When a Bad Taste Turns Good. *Journal of Neurophysiology*, 96, 2399-2409. DOI: 10.1152/jn.00576.2006.
- Tinklepaugh, (1928). An experimental study of representative factors in monkeys. *Journal of Comparative Psychology*, 8, 197–236. DOI: 10.1037/h0075798.
- Ueno, A., Ueno, Y. & Tmonagac, M. (2004). Facial responses to four basic tastes in newborn rhesus macaques (*Macaca mulatta*) and chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Behavioural Brain Research*, 154, 261–271. DOI: 10.1016/j.bbr.2004.02.014.
- UM News Service. (2011, Junio, 07). Baby & rat taste 'liking'. [Archivo de video]. Recuperado de <https://www.youtube.com/watch?v=Qofqzo3jx50>.
- Upton, K.J & Sullivan, R.M. (2010). Defining Age Limits of the Sensitive Period for Attachment Learning in Rat Pups. *Developmental Psychobiology*, 52, 453–464. DOI: 10.1002/dev.20448.
- Weatherly, J.N., Melville, C.L., & Swindell, S. (1997). Behavioral contrast with changes in duration and rate of reinforcement. *Behavioural Processes*, 40, 61–73. DOI: 10.1016/S0376-6357(96)00772-3.
- Weinstock, S. (1954). Resistance to extinction of a running response following partial reinforcement under widely spaced trials. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 47, 318-322.
- Weinstock, S. (1958). Acquisition and extinction of a partially reinforced running response at a 24-hour intertrial interval. *Journal of Experimental Psychology*, 56, 151-158.

Wood, M., Daniel, A.M. & Papini, M.R. (2005). Selective Effects of the-Opioid Receptor Agonist DPDPE on Consummatory Successive Negative Contrast. *Behavioral Neuroscience*, 119, 446 – 454. DOI: 10.1037/0735-7044.119.2.446

Wood, M.D., Norris, J.N., Daniel, A.M. & Papini, M.R. (2008). Trial-selective effects of U50, 488H, a κ -opioid receptor agonist, on consummatory successive negative contrast. *Behavioural Brain Research*, 193, 28-36. DOI: 10.1016/j.bbr.2008.04.016.

Listado de abreviaturas

DP: Día Posnatal

ERPA: Efecto de Refuerzo Parcial en la Adquisición

ERPE: Efecto de Refuerzo Parcial en la Extinción

EMRA: Efecto de la Magnitud del Refuerzo en la Adquisición

EMRE: Efecto de la Magnitud del Refuerzo en la Extinción

EMVRE: Efecto de Magnitud Variable del Refuerzo sobre la Extinción

EPR: Efectos Paradójicos del Reforzamiento

CNsim: Contraste Negativo simultáneo

CNS: Contraste Negativo Sucesivo

CNSi: Contraste Negativo Sucesivo instrumental

CNSc: Contraste Negativo Sucesivo consumatorio

CPS: Contraste Positivo Sucesivo

CPSi: Contraste Positivo Sucesivo instrumental

CPSc: Contraste Positivo Sucesivo consumatorio

LiCl: Cloruro de Litio

NaCl: Cloruro de Sodio

PA: Patrón de Alternancia

RD: Respuesta Demorada

RC: Reforzamiento Continuo

RP: Reforzamiento Parcial

RPRE: Retraso Parcial del Refuerzo sobre la Extinción

TRS: Test de Reactividad al Sabor