



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación

Trabajo Fin de Grado

**Implicación de la
amígdala central, el
núcleo accumbens y la
habénula lateral en el
circuito neurobiológico
de la frustración**

Alumna: Ana Isabel Sánchez Blanco

Tutora: Prof. Dña. Carmen Torres Bares
Dpto.: Psicología
Área: Psicobiología

Junio, 2022

ÍNDICE

Resumen	2
Abstract	3
1. Introducción	4
2. Método	14
2.1. Sujetos	14
2.2. Aparatos	14
2.3. Procedimiento	15
2.3.1. Conducta	15
2.3.2. Histología	16
2.4. Análisis estadísticos	18
3. Resultados	18
3.1. Conducta	18
3.2. Histología	20
Discusión	22
Referencias	27

Resumen

La frustración es la reacción de un organismo a una situación en la que recibe una recompensa de menor magnitud o calidad a la esperada, generando una respuesta emocional negativa manifestada en su conducta, afecto y estado fisiológico. Se trata de un fenómeno psicológico experimentado por las personas con bastante frecuencia en su vida diaria, que ha sido estudiado mediante modelos animales como, por ejemplo, el contraste sucesivo negativo consumatorio (CSNc). En el presente Trabajo de Fin de Grado (TFG) se utilizó este paradigma experimental con el objetivo de avanzar en el conocimiento del circuito neurobiológico implicado en la frustración. Con este fin, se midieron los niveles del marcador de actividad neural *c-fos* en algunas de las regiones de interés (ROIs) implicadas en el componente emocional negativo del CSNc: el subnúcleo central de la amígdala (CeA), el núcleo accumbens (NAc) y la habénula lateral (LHb). Para ello, 18 ratas Wistar macho fueron expuestas a diferentes concentraciones de sacarosa durante sesiones de cinco minutos: 32% durante 10 sesiones -fase de precambio- y 2% durante una sesión -fase de postcambio- en el grupo 32-2 (grupo de contraste); 32% durante 11 sesiones en el grupo 32-32; y 2% durante 11 sesiones en el grupo 2-2. Los resultados conductuales replicaron los datos obtenidos en estudios previos, dado que, en la fase de precambio, los grupos expuestos a la concentración de sacarosa de alto valor (32-2 y 32-32) mostraron valores de consumo de la solución (ml/kg) superiores a los mostrados por el grupo con acceso a la solución de sacarosa de bajo valor (2-2). Por su parte, en la fase de postcambio el grupo devaluado 32-2 mostró un menor consumo de la solución al 2% cuando fue comparado con el grupo 2-2, una diferencia que define el efecto de CSNc. Se inició asimismo la cuantificación de la expresión de *c-fos* en las ROIs anteriormente mencionadas y, si bien los resultados están aún en su fase preliminar, estos se discuten en relación con la evidencia científica disponible acerca de la implicación de dichas estructuras cerebrales en el procesamiento del componente emocional negativo responsable del efecto de CSNc.

Palabras clave: contraste sucesivo negativo consumatorio (CSNc); devaluación de recompensa; emoción negativa; frustración; habénula lateral (LHb); núcleo accumbens (NAc); subnúcleo central de la amígdala (CeA).

Abstract

Frustration is the reaction of an organism to a situation in which it receives a reward of less magnitude or quality than expected, generating a negative emotional response manifested in its behavior, affect and physiological state. It is a psychological phenomenon experienced by people quite frequently in their daily lives, which has been studied using animal models, such as the consummatory negative successive contrast (CSNc). In this Final Degree Project, this experimental paradigm was used with the aim of advancing in the knowledge of the neurobiological circuit involved in frustration. To this end, the levels of the neural activity marker *c-fos* were measured in some of the regions of interest (ROIs) involved in the negative emotional component of the CSNc: the central subnucleus of the amygdala (CeA), the nucleus accumbens (NAc) and the lateral habenula (LHb). For this, 18 male Wistar rats were exposed to different concentrations of sucrose during five-minute sessions: 32% during 10 sessions -preshift phase- and 2% during one session -postshift phase- in group 32-2 (contrast group); 32% during 11 sessions in the 32-32 group; and 2% during 11 sessions in the 2-2 group. The behavioral results replicated the data obtained in previous studies, given that, in preshift phase the groups exposed to the high value sucrose concentration (32-2 and 32-32) showed values of consumption of the solution (ml/ kg) higher than those shown by the group with access to the low value sucrose solution (2-2). In postshift phase, the 32-2 devalued group showed a lower consumption of the 2% solution when compared to the 2-2 group, a difference that defines the CSNc effect. Quantification of the expression of *c-fos* in the aforementioned ROIs was also started and, although the results are still in their preliminary phase, they are discussed in relation to the available scientific evidence about the involvement of these brain structures in the processing of the negative emotional component responsible for the effect of CSNc.

Key words: consummatory successive negative contrast (cSNC); central subnucleus of the amygdala (CeA); frustration; lateral habenula (LHb); negative emotion; nucleus accumbens (NAc); reward devaluation.

1. Introducción

El término frustración se refiere a un fenómeno psicológico que experimentan las personas con bastante frecuencia y que afecta al óptimo desarrollo de su vida diaria, dado su profundo impacto en el bienestar físico y mental (Torres *et al.*, en revisión). De hecho, todas las personas alguna vez en su vida se han sentido frustradas, ya sea por no haber logrado un propósito u objetivo, por no haber podido satisfacer una necesidad o deseo, o bien por perder algo importante sin poder hacer nada para evitarlo. De esta manera, algunas de las múltiples situaciones que van acompañadas de la frustración son, por ejemplo, el desempleo, la precariedad laboral, las pérdidas financieras, el divorcio, la muerte de un familiar o ser querido, la pobreza, la jubilación o no aprobar unas oposiciones tras haber empleado mucho esfuerzo para ello. Estas experiencias pueden derivar en conflictos, comportamiento agresivo, respuestas de escape, estrés, activación emocional, síntomas de depresión y una gran variedad de consecuencias adicionales que no tienen por qué ser inmediatas (Papini *et al.*, 2015).

De hecho, un ejemplo claro de cómo la pérdida repentina de un reforzamiento induce frustración y sus relevantes consecuencias e implicaciones en la vida diaria de las personas ha sido la actual crisis sanitaria mundial derivada de la pandemia por la enfermedad infecciosa denominada COVID-19 (Coronavirus Disease, 2019), junto con las recomendaciones establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para minimizar su propagación (confinamiento, cuarentena, distancia social, reducción de actividades colectivas y de ocio, etc.). Todo ello ha supuesto la pérdida repentina de fuentes de reforzamiento significativas, lo cual ha desencadenado una crisis socio-económica con profundas consecuencias psicológicas, entre las que se destacan miedos específicos e incontrolados relacionados con la infección, ansiedad generalizada, frustración, soledad, evitación, depresión, insomnio, consumo nocivo de alcohol, abstinencia de drogas, comportamiento suicida, etc. Además, también se ha constatado un aumento en la prevalencia de enfermedades mentales como los trastornos por estrés postraumático, la ansiedad generalizada, el trastorno obsesivo-compulsivo y trastornos por abuso de sustancias (Torres *et al.*, en revisión).

El término frustración tiene diversas conceptualizaciones, dado el uso coloquial general que se hace de él al estar implicado en multitud de situaciones cotidianas (revisado en Torres *et al.*, 2021). De hecho, en la actualidad aún no existe una acepción consensuada de su definición operacional por diversos motivos, entre los que se encuentra su estrecha relación con el concepto de dolor, dado que cualquier circunstancia en la que aparezca dolor físico, social o psicológico irá acompañada de respuestas conductuales y emocionales

características, algunas de las cuales serán consecuencia de la frustración (Papini *et al.*, 2015). Al mismo tiempo, otra circunstancia que dificulta la definición de frustración es su uso cotidiano como rasgo de carácter para describir la capacidad de tolerar situaciones en las que los deseos no se satisfacen, lo cual depende de factores biológicos, prácticas de crianza y experiencias tempranas (Torres *et al.*, 2021).

Por otra parte, al intentar estudiar científicamente la frustración aparece otra cuestión que dificulta aún más su definición operacional, dado que el término puede adquirir distintos significados dependiendo de a qué aspecto de la experimentación se haga referencia. En efecto, se puede hacer referencia a la frustración como una condición inductora externa (variable independiente), o como una variable dependiente en la que se miden las respuestas conductuales y emocionales inducidas por la manipulación de la primera (Papini *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2021). Por lo tanto, queda patente que el término frustración es un constructo psicológico multidimensional que ha tenido una gran variedad de conceptualizaciones en el ámbito de la psicología a lo largo de la historia (Torres *et al.*, 2021).

En este sentido, los primeros autores que acuñaron desde una perspectiva psicoanalítica el término frustración fueron Freud (1958) y Rosenzweig (1934), para posteriormente Dollard (1939) y Miller (1941) poner el énfasis en la respuesta conductual derivada de ella, y Gray (1987) y Berkowitz (1989) añadir la dimensión emocional a dicho constructo (Torres *et al.*, en revisión). En este sentido, Gray (1987) fue uno de los primeros autores en mencionar la dimensión afectiva de la frustración y estudiar sus bases biológicas con modelos animales, evidenciando que el miedo y la frustración son estados emocionales funcionalmente equivalentes y dependientes de los mismos circuitos cerebrales (Torres *et al.*, en revisión).

Más aún, planteamientos más recientes incorporaron la variable cognitiva, asociando la frustración con la violación de una expectativa de recompensa construida sobre la base de la experiencia (Amsel, 1992), teoría que supuso un intento de analizar científicamente con modelos animales cómo la cognición y la emoción modulan el aprendizaje y la conducta, diferenciando entre frustración primaria y secundaria (o condicionada). Así, la frustración primaria sería el estado emocional aversivo provocado por la violación de la expectativa de una recompensa, mientras que la frustración secundaria aparecería cuando dicho estado se asocia con las claves contextuales presentes en la situación experimental. Dicha frustración secundaria sería la responsable del conflicto de aproximación-evitación característico de las situaciones de pérdida de incentivos (Amsel, 1994).

Por su parte, Flaherty (1996) desarrolló un modelo dinámico multi-etapas para explicar lo que sucede en situaciones en las que un organismo experimenta la devaluación de una recompensa esperada, teniendo que detectar que se ha producido un cambio en la magnitud del incentivo al comparar la recompensa actual con el recuerdo de la recibida anteriormente. Así, un resultado negativo en dicha comparación generaría una reacción inicial de rechazo de la nueva recompensa e induciría conductas exploratorias de búsqueda de la anterior. Una vez evaluado el valor del refuerzo devaluado y comprobado que no existe otro disponible, en el animal se induciría un estado emocional negativo (decepción) resultante en un conflicto de aproximación-evitación, dado que, aunque el valor absoluto del incentivo motivaría al acercamiento, el valor relativo de dicho incentivo motivaría su evitación (Flaherty, 1996).

Finalmente, un planteamiento teórico más reciente es el propuesto por Papini (Papini *et al.*, 2022), el cual afirma que cuando se produce un cambio negativo en el valor de un incentivo el organismo se adapta a través de dos procesos de aprendizaje. En primer lugar, se pondría en marcha el aprendizaje aloentrico mediante la interacción con las nuevas condiciones del incentivo, promoviendo así la adquisición de una memoria basada en las propiedades de la nueva recompensa. El aprendizaje egocéntrico, por su parte, permitiría al organismo aprender de su propia reacción emocional, adquiriendo así la capacidad de anticiparla (Papini *et al.*, 2006). Este aprendizaje tendría una clara función adaptativa, al promover el desapego a los estímulos asociados con incentivos que ya no están disponibles y facilitar el cambio a un modo de búsqueda que posibilitaría la detección de nuevos recursos (Papini *et al.*, 2022).

Una vez revisada toda la controversia con respecto a las distintas conceptualizaciones del término frustración y acorde al objetivo del presente Trabajo Fin de Grado (TFG), la definición que se usará como referencia será la propuesta por Papini (2003), quien la define como la reacción de un organismo a una situación en la que, de forma inesperada y abrupta, recibe un incentivo de menor magnitud o calidad al esperado, una violación de la expectativa de recompensa que generará una respuesta emocional negativa manifestada en la conducta, el afecto y el estado fisiológico del individuo.

Por otro lado, en el estudio experimental de la frustración en humanos existe también gran controversia debido a la amplia variedad de protocolos experimentales utilizados y a la dificultad de poder controlar las variables intervinientes. No obstante, hay estudios donde, a través de tareas de ordenador, se induce frustración mediante la pérdida total o parcial de un

reforzador (monetario en la gran mayoría de los casos), su demora, su presentación intermitente o su inesperada inaccesibilidad, así como a través de la presentación de problemas de dificultad creciente o irresolubles. De hecho, en estos procedimientos experimentales se utilizan diversas técnicas en función de las variables dependientes de interés, entre ellas, el tiempo de reacción, el número de respuesta correctas o su precisión. Además, en estos procedimientos suelen utilizarse también medidas electrofisiológicas como, por ejemplo, la actividad electroencefalográfica y electrodermal, medidas de actividad neuronal como, por ejemplo, la resonancia magnética funcional y los potenciales evocados, así como medidas subjetivas de afecto negativo registradas mediante autoinformes (Torres *et al.*, 2021).

Sin embargo, estos estudios con humanos tienen numerosas discrepancias y contradicciones debidas, entre otras causas, a sus diferencias metodológicas, las características de los participantes, la naturaleza y/o intensidad de la experiencia de frustración inducida, la utilización de medidas subjetivas como variables dependientes, la falta de grupos controles adecuados o la casi exclusividad del dolor social como variable inductora de la frustración (Torres *et al.*, 2021). Por lo tanto, debido a la variedad de enfoques conceptuales, teóricos y experimentales con los que se ha abordado el análisis de la frustración en humanos sería recomendable la utilización de modelos animales para su estudio, dado que éstos proporcionan un paradigma experimental idóneo para analizar desde una perspectiva psicobiológica el valor de la recompensa y las consecuencias conductuales derivadas de su pérdida.

En este sentido, el estudio experimental de la frustración con modelos animales es conceptualizado por algunos autores como un modelo de dolor psicológico, definido éste como las consecuencias emocionales aversivas derivadas de la exposición a un evento de pérdida como, por ejemplo, la obtención de una recompensa de menor magnitud a la esperada (Papini *et al.*, 2006). De hecho, esta experiencia de pérdida de recompensa se puede inducir a través de tres situaciones experimentales distintas: a) inaccesibilidad de recompensa, lo que produciría la obstrucción de la respuesta; b) omisión de recompensa, lo cual implica eliminar completamente el reforzador; y c) devaluación de recompensa, en la que el reforzador es devaluado, pero no eliminado por completo (Papini *et al.*, 2015). Por ejemplo, para el estudio de la omisión de recompensa se ha utilizado el procedimiento de extinción apetitiva, en el cual los animales reciben una recompensa tras la ejecución de una respuesta (fase de adquisición) para posteriormente ser omitida (fase de extinción). Ello induce el deterioro o

disminución de dicha respuesta tras un aumento inicial en la fuerza de la misma (Torres y Papini, 2017). También se puede observar agresión, agitación, vocalizaciones ultrasónicas, respuestas similares a la ansiedad, escape, inmovilización, comportamiento de búsqueda, etc., comportamientos asociados con una reacción emocional negativa generada por la pérdida del reforzador (Papini *et al.*, 2015).

Con respecto a la manipulación de la devaluación de la recompensa, destaca el contraste sucesivo negativo (CSN), un fenómeno paradójico del aprendizaje que consiste en una reducción o deterioro transitorio en la respuesta ante bajos niveles de recompensa (fase de postcambio) que se observa en animales que previamente han sido expuestos a valores de recompensa superiores (fase de precambio), en comparación con la ejecución de un grupo control que siempre recibe bajos niveles de recompensa (Papini y Torres, 2017). Dentro de este modelo se pueden diferenciar 3 modalidades distintas: el CSN pavloviano (CSNp), el CSN instrumental (CSNi) y el CSN consumatorio (CSNc). Así, el CSNp implica una situación de auto-moldeamiento pavloviano en la cual el animal, tras la reducción de la cantidad de comida disponible asociada con la presentación de una palanca (de 12 a 2 pellets), muestra preferencia por la palanca que proporciona 2 pellets en ambas fases (Torres y Papini, en prensa).

Con respecto al CSNi, éste analiza cómo la devaluación en la magnitud de una recompensa afecta a la respuesta instrumental asociada con la consecución de la misma, manifestándose, por ejemplo, en un aumento transitorio en la latencia de dicha respuesta (p.ej. recorrer un laberinto recto para conseguir la recompensa; Torres *et al.*, en revisión).

Por su parte, en el CSNc, que será la modalidad utilizada en el presente TFG, un grupo de animales tiene acceso diario durante 5 min a una solución apetitiva de sacarosa al 32% durante 10 sesiones en días consecutivos (fase de precambio), y a una solución al 2% (o al 4% en otros estudios) durante 4 o 5 sesiones adicionales (fase de postcambio). La respuesta consumatoria de estos animales se compara con la mostrada por un grupo control que siempre ha recibido acceso a la solución de bajo valor (2% o 4%). De esta manera, el efecto de contraste se observa cuando los animales del grupo devaluado muestran una supresión transitoria de la respuesta consumatoria (beben menos) en comparación con el grupo control (Figura 1; Torres *et al.*, 2021).

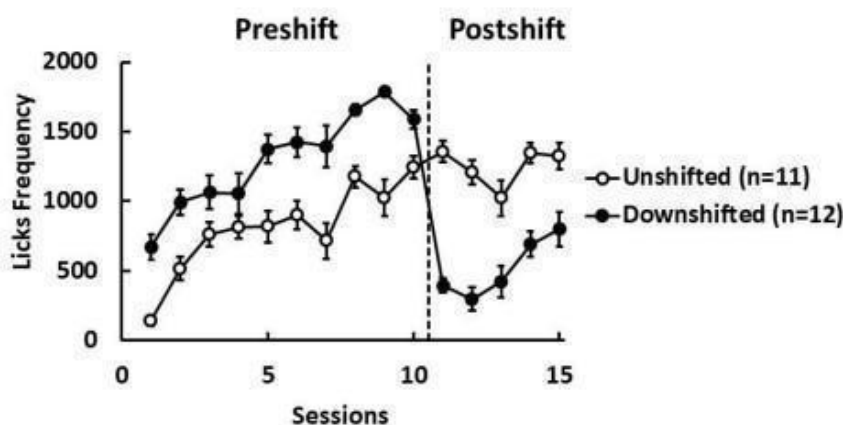


Fig. 1: Gráfica representativa del procedimiento de CSNc (tomado de Torres *et al.*, 2021).

De hecho, dado que el CSNc posee suficiente validez aparente, predictiva y de constructo, se trata de uno de los paradigmas experimentales más utilizado para el estudio de las bases psicobiológicas de la frustración (Torres *et al.*, 2021). En efecto, existe amplia evidencia endocrina, farmacológica y neurobiológica que sustenta la premisa de que la supresión consumatoria que caracteriza al CSNc puede ser debida a la frustración inducida por la pérdida del reforzador (Papini *et al.*, 2022; Torres y Papini, en prensa). En este sentido, la evidencia endocrina ha puesto de manifiesto, por ejemplo, que en el grupo devaluado se induce una respuesta de estrés mediada por la hiperactivación del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HPA) en el segundo día de postcambio (Pecoraro *et al.*, 2009).

Por otro lado, los trabajos farmacológicos para el estudio de las bases neuroquímicas que median la frustración inducida en el CSNc han mostrado que dicho modelo es sensible a la acción de fármacos opioides, ansiolíticos y cannabinoides, sustancias todas ellas moduladoras del afecto negativo y del dolor psicológico inducido por las situaciones de pérdida (Flaherty, 1996; Liao y Chuang, 2003). Así, por ejemplo, la administración de agonistas (morfina) o antagonistas (naloxona) no selectivos de los receptores opioides disminuye y aumenta, respectivamente, el efecto de CSNc, mientras que ansiolíticos como las benzodiacepinas y el alcohol reducen dicho efecto (Ortega *et al.*, 2017).

Por último, en cuanto a la evidencia neurobiológica, en la cual se centrará el presente TFG, la mayoría de los estudios han abordado el análisis de la circuitería cerebral implicada en el CSNc mediante la inactivación de las estructuras cerebrales de interés (p.ej. Guarino *et*

al., 2020; Leszczuk y Flatherty, 2000) y a través de la cuantificación de la expresión de marcadores específicos de actividad neural (p.ej. *c-fos*; Pecoraro y Dallman, 2005) o de plasticidad sináptica (p.ej. *pCREB*; Glueck *et al.*, 2015). Fruto de estos estudios ha sido el desarrollo de un modelo del sistema cerebral implicado en el CSNc (Figura 2):

Fig. 2: Circuito cerebral implicado en el CSNc (tomado de Ortega *et al.*, 2017). ACC: corteza cingulada anterior; BLA: subnúcleo basolateral de la amígdala; CeA: subnúcleo central de la amígdala; CI: corteza insular; LHb: habénula lateral; NAc: núcleo accumbens; NST: núcleo del tracto solitario; PbN: núcleo parabraquial; PFC: corteza prefrontal; VTA: área tegmental ventral.

de la emoción negativa, la cual inhibiría el circuito responsable de la respuesta de lamido, dando como resultado la supresión de la conducta consumatoria (Ortega *et al.*, 2017).

En este sentido, existe numerosa evidencia experimental que sugiere la implicación de la amígdala en el componente emocional negativo responsable del efecto de CSNc. En primer lugar, Becker *et al.* (1984) observaron que las lesiones de la amígdala lateral (que incluye el BLA y los subnúcleos lateral y basomedial) atenúan el efecto del CSNc, mientras que las lesiones de la amígdala central (que incluye al CeA y el subnúcleo corticomedial) lo eliminan completamente (Becker *et al.*, 1984). Por su parte, Liao y Chuang (2003) estudiaron el efecto de la administración de diazepam directamente en la amígdala y el hipocampo en el CSNc, observando que dicha manipulación atenuaba el efecto de contraste sólo cuando se administraba en la amígdala. Además, Kawasaki *et al.* (2015) mostraron que la inactivación, mediante microinfusiones de lidocaína, de la amígdala centromedial (que incluye el CeA) reducía el efecto del CSNc y aumentaba el comportamiento exploratorio en el campo abierto, ambos efectos consistentes con una reducción del estado emocional negativo. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el CeA está implicado en la atribución de la valencia aversiva de la experiencia de devaluación de una recompensa (Kawasaki *et al.*, 2015).

No obstante, en estos experimentos previos la manipulación neuroanatómica no estaba circunscrita específicamente al CeA, por lo que estudios posteriores se centraron en analizar la implicación concreta de este subnúcleo amigdalino en el CSNc, utilizando para ello técnicas de quimiogenética (DREADDs). Estos trabajos mostraron que la inhibición del CeA antes de las sesiones de postcambio elimina el efecto de contraste (Guarino *et al.*, 2020). Estos resultados apoyan la idea de que el CeA es necesario para inducir la supresión consumatoria que acompaña a la devaluación de la recompensa en el CSNc, induciendo el rechazo de una recompensa aceptable cuando se violan las expectativas positivas previas (Guarino *et al.*, 2020).

Si bien estos estudios ponen de manifiesto la relevancia de la CeA en la modulación de la emoción negativa inducida por la devaluación del reforzador, es sabido que otras regiones cerebrales modulan, a su vez, la actividad de esta región cerebral, por lo que el circuito cerebral responsable de la frustración es ciertamente complejo y aún por determinar. En primer lugar, la actividad de la CeA está regulada por el núcleo accumbens (NAc), el estriado dorsal (ED), la habénula lateral (LHb), el área tegmental ventral (VTA) y por aferencias inhibitorias procedentes de la conexión entre el BLA y la corteza cingulada anterior (ACC; Ortega *et al.*, 2017). De hecho, dicha acción inhibitoria del ACC sobre las

neuronas del CeA sería coherente con el retraso en la recuperación de la respuesta consumatoria del CSNc que se ha observado tras las lesiones electrolíticas de dicha región cortical (Ortega *et al.*, 2011). Además, se ha sugerido que la ACC está involucrada en la respuesta emocional provocada por la reducción de la recompensa al inducir el aprendizaje de las nuevas condiciones de incentivo (Ortega *et al.*, 2011). Por otro lado, en la emoción negativa interviene también la conexión BLA-NAc, la cual parece ser la responsable de la reducción de la liberación de dopamina en el NAc inducida por las discrepancias negativas entre las recompensas de diferente magnitud, dado que se ha observado una reducción significativa en la liberación de dopamina en el NAc durante la primera sesión de devaluación de la recompensa (Genn *et al.*, 2004).

Más aún, existe la hipótesis de que el CeA también recibiría una influencia moduladora adicional a través de la vía que conecta el NAc con el ED y la LHb (Ortega *et al.*, 2017). De hecho, la LHb, una región implicada en la detección de ausencia de recompensa (Matsumoto e Hikosaka, 2007), inhibiría la actividad del VTA, lo cual, a su vez, podría afectar a regiones aún no identificadas de la corteza prefrontal (CPF), las cuales, en última instancia, serían las responsables de la activación del CeA (Ortega *et al.*, 2017). De hecho, existen estudios de lesiones electrolíticas de la región medial de la CPF (CPFm) y de la corteza orbital ventrolateral (VLO) que se han realizado con el objetivo de evaluar la implicación diferencial de estas regiones corticales en el CSNc. En este sentido, Ortega *et al.* (2013) mostraron que, aunque la inactivación de la CPFm no mostró efecto alguno, las lesiones de la VLO redujeron la supresión del comportamiento consumatorio sólo durante la primera sesión de postcambio, sugiriendo que esta región cortical podría ejercer acciones motivacionales y emocionales influenciando el comportamiento en situaciones que implican cambios de incentivo (Ortega *et al.*, 2013). En definitiva, la activación del CeA (y la emoción negativa resultante) podría ser el resultado de las aferencias excitatorias procedentes del BLA y la CPF, así como de las aferencias inhibitorias procedentes de la ACC, por lo que para que pueda inducirse el efecto de CSNc sería necesario que la activación del CeA predominara sobre las influencias corticales inhibitorias (Ortega *et al.*, 2017).

Como puede comprobarse, la revisión realizada en estas páginas pone de manifiesto la complejidad del circuito cerebral responsable del efecto del CSNc y la necesidad de seguir avanzando en su estudio científico a través de la realización de experimentos que pongan en relación las propiedades funcionales de las regiones neurales integrantes de dicho circuito. Por lo tanto, el objetivo del presente TFG ha sido iniciar el estudio integrado del conectoma

cerebral funcional del CSNc a través de la cuantificación de la expresión de *c-fos*, un factor de transcripción genética utilizado habitualmente como marcador de actividad neural (Kovacs, 1998). Por su especial relevancia para el componente de la emoción negativa inducida a través del CSNc, el presente TFG se centró en tres regiones cerebrales, a saber, el CeA, el NAc y la LHb, cuya implicación en el fenómeno de la frustración ha sido puesta de manifiesto en la presente revisión (Ortega *et al.*, 2017). Además, dicha implicación también está respaldada por la evidencia obtenida en el estudio llevado a cabo por Pecoraro y Dallman (2005), en el cual se observó un aumento en la expresión de *c-fos* en la parte medial de la LHb (LHbm) y en el NAc en la primera sesión de postcambio en el grupo devaluado (32-4) en comparación con los grupos controles (4-4 y 32-32). Sin embargo, el aumento de la expresión de *c-fos* en el CeA se observó solo en el grupo no devaluado 32-32% y tras la segunda sesión de devaluación, sin mostrarse efecto alguno en la primera sesión de postcambio (Pecoraro y Dallman, 2005). No obstante, como ha sido comentado anteriormente, existen estudios donde se muestra la implicación del CeA en la emoción negativa resultante de la devaluación de una recompensa (Guarino *et al.*, 2020; Kawasaki *et al.*, 2015) por lo que dichas discrepancias justifican el objetivo del presente TFG.

Por lo tanto, para la realización de este estudio preliminar se parte de la hipótesis de que la devaluación inesperada y abrupta en el valor de una recompensa en un modelo animal de CSNc en ratas provocaría en estos animales una respuesta emocional negativa transitoria (frustración) que interferiría con la respuesta consumatoria de lamido de la solución de sacarosa (Flaherty, 1996). Esta respuesta emocional, a su vez, dependería de la activación de ROIs interconectadas entre ellas como, por ejemplo, el CeA, el NAc y la LHb (Ortega *et al.*, 2017; Papini *et al.*, 2022). Sobre la base de estas hipótesis, se derivarían las siguientes predicciones:

a) Las ratas expuestas a la devaluación de la recompensa (grupo experimental, 32-2) suprimirán o reducirán la conducta consumatoria en el modelo de CSNc en comparación con los animales no devaluados (grupos controles 32-32 y 2-2).

b) Existirá una mayor expresión de *c-fos* en las ROIs (CeA, NAc y LHb) de los animales del grupo experimental en comparación con las de los animales de los grupos controles.

c) Existirá una correlación positiva significativa en la activación de las ROIs de los animales del grupo experimental, en contraposición a las de los animales del grupo control.

2. Método

2.1. Sujetos

Para la realización de este experimento se utilizaron como sujetos 18 ratas macho Wistar procedentes de Envigo (Barcelona, España) las cuales, a su llegada al laboratorio, fueron alojadas individualmente en su jaula-hogar con agua *ad libitum*, a una temperatura ambiental aproximada de 20°C y una humedad del 50%. El ciclo de luz-oscuridad tuvo una duración de 12 horas, encendiéndose las luces a las 7:00 h y apagándose a las 19:00 h de forma gradual. El peso medio de las ratas al inicio del experimento era de 388,6 gramos (desviación típica de 36,5 gramos) y se les sometió a condiciones de privación de comida, teniendo como objetivo que se mantuvieran entre el 82% y el 85% de su peso, alimentándolos 30 minutos después de cada sesión experimental.

Esta investigación fue realizada de acuerdo con las guías de la UE para el uso de animales en investigación (2010/63/EU) y ley española (6/2013; R.D. 53/2013): “Ley 32/2007, del 7 de Noviembre, para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio; Ley 6/2013, del 11 de Junio, de modificación de la Ley 32/2007; y R.D. 53/2013, de 1 de Febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos”. Además, todos los protocolos conductuales utilizados fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Jaén (UJA).

2.2. Aparatos

El presente estudio se llevó a cabo en el Centro de Producción y Experimentación Animal (CPEA) (alojamiento y cuidado de los animales, realización de las pruebas conductuales, perfusión y extracción del cerebro), en el Centro de Instrumentación Científico-Técnica (corte del tejido cerebral mediante criostato, visualización del tejido cerebral y de la expresión de *c-fos* con microscopía) y en los laboratorios de Biología Experimental (tinción celular e inmunohistoquímica) de la UJA.

Los animales fueron pesados diariamente con una báscula digital (Baxtram, BS3, Girona, España) y para inducir los efectos de CSNc a través de la manipulación de las concentraciones de sacarosa se utilizaron cajas de consumo de plexiglás 30 x 30 x 15 cm, con la parte inferior abierta y colocadas sobre una bandeja del mismo material cubierta con serrín. En la pared frontal de cada una de estas cajas, a unos 10 cm del suelo, se localizaba un

orificio a través del cual se introdujo una bureta graduada que lleva acoplada una boquilla en su parte distal, la cual estaba inmovilizada mediante un soporte metálico con pinzas de sujeción.

Por otra parte, las soluciones de sacarosa se prepararon diariamente utilizando una balanza (Cobos, Precisa 125A, Barcelona, España) y un agitador magnético (Nahita Magnetic Stirrer 680-9, Beriaín, España). Para medir el tiempo que duraba la sesión consumatoria (5 min) se utilizaron 8 cronómetros manuales (Extech, 365510, Madrid, España), los cuales comenzaban a contabilizar desde el primer lametón del animal a la boquilla de la bureta.

El almacenamiento de los datos, tanto de la tarea consumatoria como del peso diario de los animales, se llevó a cabo a través de una hoja de registro para su posterior transcripción al archivo del programa estadístico SPSS (versión 26.0, IBM, NY, USA).

Por último, para seccionar el cerebro se utilizó un criostato (Leica, CM1950, Barcelona, España) y para visualizar las regiones cerebrales de interés y la expresión de *c-fos* se usó un microscopio estereoscópico (Leica, MSV269, Wetzlar, Alemania), un microscopio invertido (Leica, DM IRB, Wetzlar, Alemania) y una cámara digital (Leica, DFC300 FX, Wetzlar, Alemania) para obtener las microfotografías.

2.3. Procedimiento

2.3.1. Conducta

Los 18 animales fueron asignados de forma aleatoria, en función de su peso corporal (para que no hubiese diferencias entre los grupos), a tres condiciones experimentales: a) el grupo de contraste experimental 32-2 (n=6); b) el grupo control 2-2 (n=6) y c) el grupo control 32-32 (n=6).

Previamente al comienzo de las sesiones experimentales de entrenamiento conductual propiamente dichas, a los animales se les sometió en un primer día a una sesión de habituación que consistió en colocar al animal en la caja consumatoria durante 5 min sin la solución de sacarosa. A continuación, comenzó la fase de precambio, que se llevó a cabo durante 10 sesiones de 5 min de duración en días consecutivos donde, en primer lugar, se pesaban a los animales y seguidamente se colocaban en la caja de consumo donde se les daba acceso a una solución de sacarosa al 32% o al 2%, dependiendo de las condiciones experimentales. Al finalizar cada una de las sesiones se contabiliza la ingesta de sacarosa

(ml/kg) de cada animal, se colocan de nuevo en su jaula-hogar y se les suministraba, 30 min después, la cantidad de comida adecuada para mantenerlos en torno al 82-85% de su peso.

El día siguiente a la última sesión de la fase precambio (día 11) comenzó la fase de postcambio, la cual consistió en una única sesión con las mismas características que las anteriores excepto que, en el grupo experimental, la solución de sacarosa que se presentó a los animales sufrió una devaluación, pasando del 32% al 2%.

2.3.2. Histología

El análisis de los niveles de expresión de *c-fos* en estructuras cerebrales se realizó sacrificando al animal 90 min después de la exposición a la situación inductora de frustración (sesión de postcambio). Para ello, los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de 80 mg/kg de pentobarbital sódico (ABBOT, Madrid, España) para, una vez alcanzado el plano quirúrgico (ausencia de reflejo podal y de la cola), colocarlos en posición decúbito supino sobre una rejilla adecuada para la recogida de los líquidos de lavado y fijación, los cuales fueron administrados mediante una bomba de perfusión (ISMATEC, MCP/BVP, Wertheim, Alemania). Tras estirar y sujetar las extremidades del animal, se realizó un corte en la piel a la altura del final del esternón, separando la piel y cortando las costillas en paralelo a los pulmones para exponer el corazón. Seguidamente, se insertó una aguja conectada a un tubo que dio acceso a la solución de lavado (tampón fosfato salino, PBS) en el ventrículo izquierdo, profundizando hasta alcanzar la aorta clamping la aguja a este nivel mediante un fórceps y realizando una incisión en la aurícula derecha para permitir el escape de la circulación de retorno de los líquidos de lavado. Posteriormente, se procedió al lavado con una solución salina y a la perfusión de la solución de fijado (formalina al 10%) hasta observar la correspondiente contracción muscular indicativa de la correcta fijación del tejido. Finalmente, se retiró la aguja y se procedió a la extracción del cerebro completo, el cual se mantuvo en una solución de formalina durante 3 h a temperatura ambiente para su posterior conservación a una temperatura de 4°C en una solución sacarosa (30%) y azida (0,02%).

Posteriormente, se procedió a la sección de los encéfalos congelándolos a -22°C y protegiéndolos con Tissue-Tek (O.C.T.TM, España) para obtener secciones transversales de tejido cerebral de 30 µm de grosor, desde el polo frontal a la médula, mediante el uso de un criostato (Leica, CM1950, Barcelona, España), siendo seleccionada una sección de cada 7 (véase Pecoraro y Dallman, 2005). Estas secciones fueron colocadas en orden serial y

mantenidas en libre flotación con PBS para su posterior montaje en portaobjetos gelatinizados.

Previo al estudio inmunohistoquímico de *c-fos* se llevó a cabo el procedimiento de tinción de Nissl o violeta de cresilo para localizar las ROIs siguiendo el protocolo propuesto por Krutsay (1970). En primer lugar, se preparó la solución de tinción diluyendo 0,12 g de acetato violeta de cresilo en 100 ml de agua destilada (H₂O_d) y se le añadió unas gotas de ácido acético glacial justo antes de filtrarla. A continuación, se hidrataron los cortes con H₂O_d durante 5 min para seguidamente teñirlos sumergiéndolos en la solución de violeta de cresilo a 57°C durante 7 min, transcurridos los cuales se procedió a su deshidratación y aclarado utilizando 3 lavados con H₂O_d seguidos de una serie creciente de alcoholes (50°, 70°, 70°, 96°, 100°) durante 2 min en cada uno y 2 lavados en xilol durante 5 min cada uno. Finalmente, se realizó el montaje del cubreobjeto usando DPX y dejándolos secar durante al menos 24 h antes de su visualización mediante un microscopio estereoscópico (Leica, MSV269, Wetzlar, Alemania) y fotografiado a un aumento de 8X con una cámara fotográfica (Leica, DFC300 FX, Wetzlar, Alemania).

Por último, para la contabilización de la expresión de *c-fos* se utilizó el procedimiento descrito por Curran *et al.* (1985). En primer lugar, se inhibió la actividad peroxidasa endógena mediante una solución de agua oxigenada al 0,3% en PBS (0,01M, pH 7,4) durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación suave, para seguidamente realizar 3 lavados con PBS (0,01 M) de 5 min cada uno a temperatura ambiente y en agitación moderada. A continuación, se procedió con la permeabilización de los cortes incubándolos con una solución de Tritón X-100 (0,1%) diluidos en PBS (0,01 M) durante 4 h a temperatura ambiente y en agitación suave para, una vez transcurrido dicho periodo, eliminar dicha solución e incubarlos con el anticuerpo primario (1:5000; Anti-c-Fos antibody – BSA free ab190289) diluido en una solución de Tritón X-100 (0,2%) en PBS (0,01 M) durante toda la noche a 4°C en agitación suave. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de PBS de 5 min cada uno antes de la incubación de los cortes con el anticuerpo secundario biotinilado (1:500; Goat anti-mouse IgG H+L) diluido en PBS (0,01 M) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación suave. Seguidamente, se realizaron 3 lavados con PBS (0,1 M) para posteriormente ser incubados durante 1,5 h con un complejo avidina-peroxidasa biotinilada (kit ABC) diluido en PBS (0,1 M) a temperatura ambiente en agitación suave. Transcurrido este tiempo, se procedió a 3 lavados con tampón acetato (0,1 M, pH 6,0) de 5 min cada uno a temperatura ambiente en agitación moderada, para posteriormente llevar a cabo el revelado mediante la

técnica de diaminobenzidina intensificada con níquel durante 6 min a temperatura ambiente y en agitación suave hasta que éstos adquirieron un color pardo. Por último, se realizaron 3 lavados con tampón acetato (0,1 M) de 5 min cada uno a temperatura ambiente y en agitación moderada.

Finalizado este procedimiento, se colocaron los cortes sobre portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar al menos durante 24 h para posteriormente proceder a su deshidratación y aclarado utilizando una serie creciente de alcoholes (50°, 70°, 96°, 100°) y xilol (I, II) durante 1 min en cada uno y el montaje del cubreobjeto con DPX para su posterior secado durante al menos 24 h.

Por su parte, la visualización de los cortes se llevó a cabo en la unidad de microscopía óptica de la UJA la cual dispone de un microscopio invertido de fluorescencia (Leica, DM IRB, Wetzlar, Alemania) y un microscopio estereoscópico (Leica, MSV269, Wetzlar, Alemania) con los cuales se realizaron microfotografías a diferentes aumentos (8X y 50X) para la contabilización de la expresión de *c-fos* mediante el *software* de análisis de imagen *ImageJ* (NIM, Bethesda, Estados Unidos). Las ROIs fueron localizadas a través de la comparación de las secciones marcadas con *c-fos* con aquellas similares teñidas con violeta de cresilo, utilizando como guía el atlas neuroanatómico de Paxinos y Watson (1998).

2.4. Análisis estadísticos

Los datos referentes al consumo de sacarosa (ml/kg) de los animales de los distintos grupos fueron sometidos a través de la versión 26.0 del paquete estadístico SPSS (IBM, NY, USA) a un análisis de varianza con 2 factores: grupo (32-32, 2-2 y 32-2) y sesión (11: 10 en la fase de precambio y 1 en la fase de postcambio). El análisis de la interacción se realizó mediante la Diferencia Mínima Significativa (DMS) derivada del análisis principal, empleándose para todas las comparaciones un nivel de significación estadística de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Conducta

La Figura 3 representa los datos correspondientes a la media de la ingesta de sacarosa (ml/kg) registrada en los diferentes grupos (2-2, 32-32 y 32-2) en cada una de las sesiones del procedimiento de CSNc. En primer lugar, se observa que en la fase de precambio los grupos que recibieron una concentración de sacarosa al 32% (grupo 32-32 y 32-2) mostraron valores de consumo superiores a los registrados en el grupo control que recibió el bajo valor de

recompensa (2-2). En segundo lugar, solo en el grupo 32-2 (devaluado) se observa una marcada reducción de la conducta consumatoria en la sesión de la fase de postcambio (día 11), no mostrándose efecto alguno en los grupos 2-2 y 32-32, siendo el nivel de consumo de dicho grupo, en esta sesión, inferior al mostrado por el grupo control 2-2.

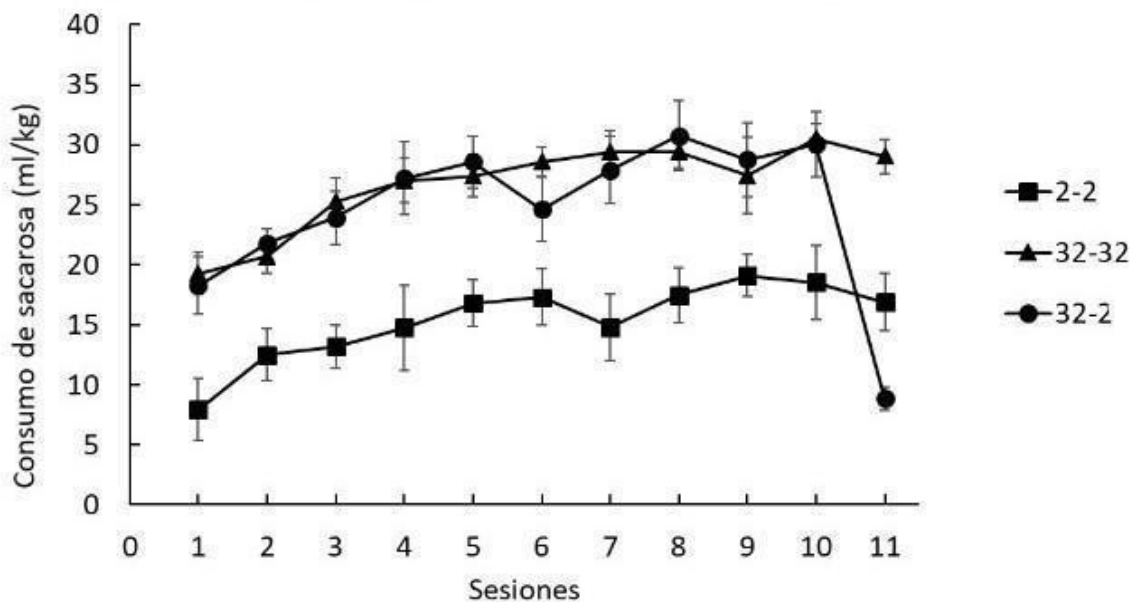


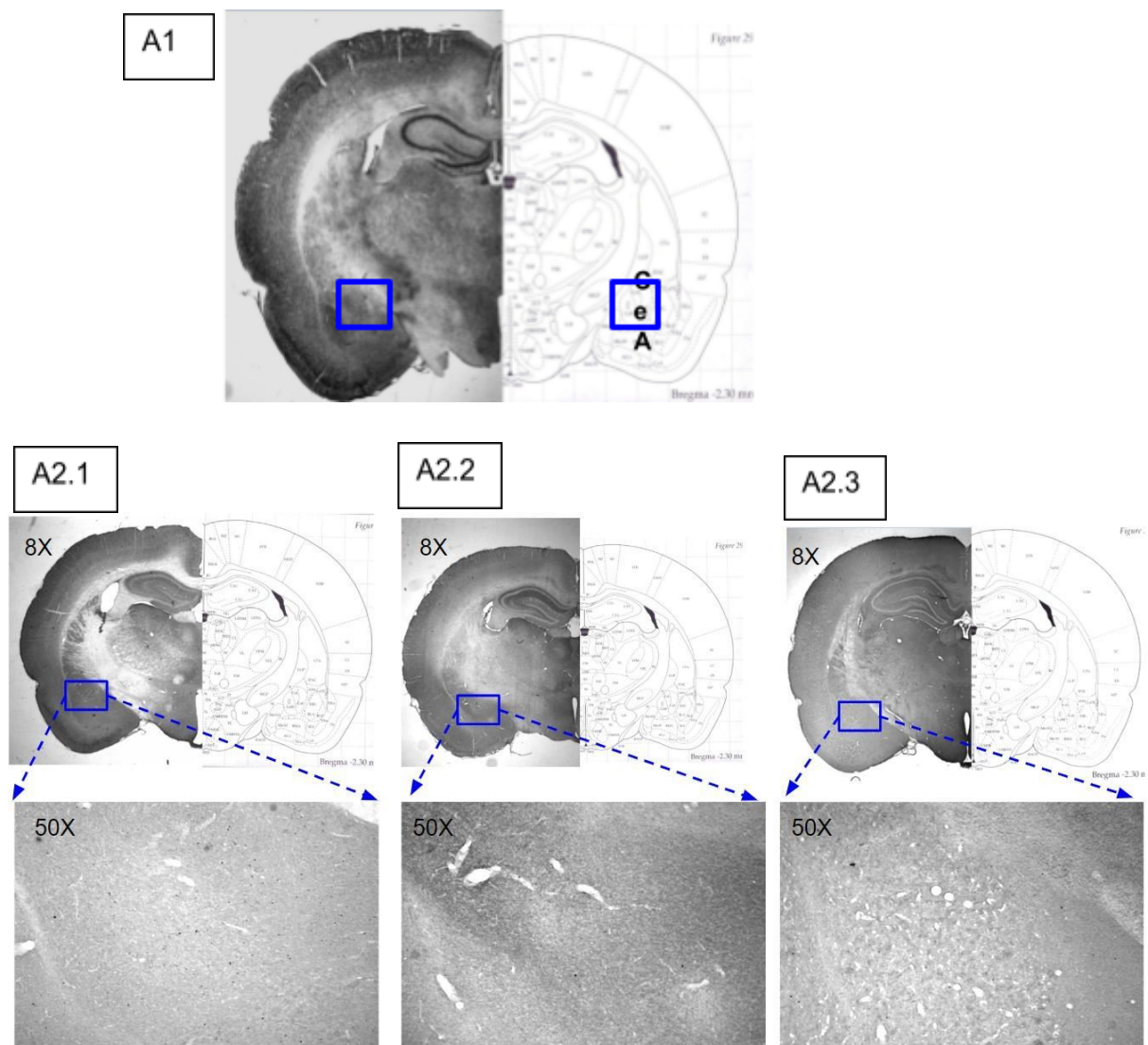
Fig. 3: Representación gráfica de la ingesta media de sacarosa (ml/kg) de los grupos 2-2, 32-32 y 32-2 en la fase de precambio (1-10) y postcambio (11) del modelo de CSNc.

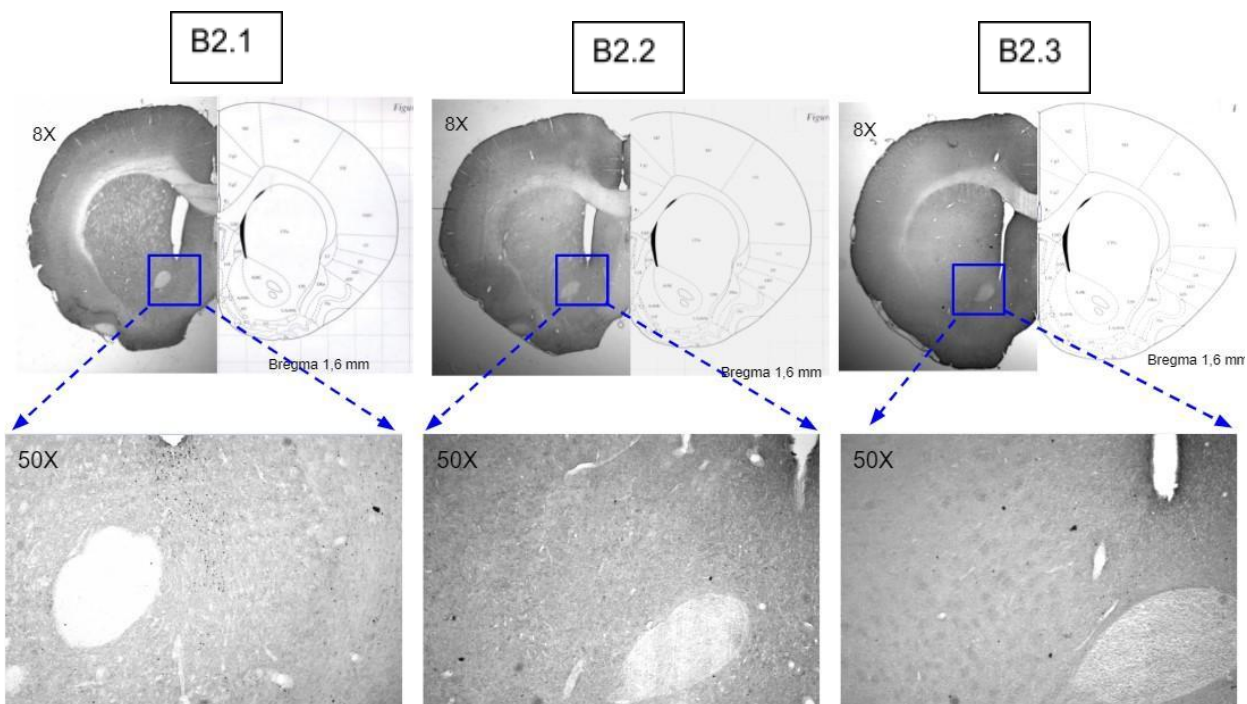
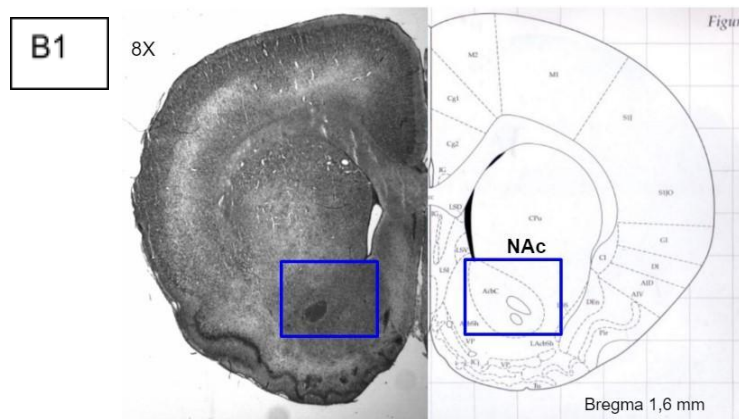
El ANOVA realizado con los datos de consumo de sacarosa confirmaron las observaciones referentes a los resultados conductuales, mostrándose un efecto significativo de las variables grupo [$F_{(2, 15)} = 12,956$, $p < 0,001$] y sesión [$F_{(10, 150)} = 15,220$, $p < 0,0001$], así como de la interacción entre ambas [$F_{(20, 150)} = 5,020$, $p < 0,0001$]. El análisis de esta interacción mostró que los grupos 32-32 y 32-2 mostraron diferencias significativas con respecto al grupo 2-2 en todas las sesiones de precambio ($p_s < 0,05$), mientras que entre ellos no aparecieron diferencias significativas ($p_s > 0,217$). Por el contrario, en la sesión de postcambio aparecieron diferencias significativas entre el grupo devaluado (32-2) y los otros dos grupos (32-32: $p < 0,0001$; 2-2: $p < 0,005$), así como entre estos dos últimos grupos ($p < 0,0001$). Por lo tanto, estos resultados muestran que, en la fase de precambio, la conducta consumatoria fue dependiente del valor absoluto de la recompensa, dado que los grupos que recibieron la concentración de mayor valor (grupos 32-32 y 32-2) consumieron mayor cantidad de sacarosa en comparación con el grupo que recibió la solución de bajo valor (2-2). Por el contrario, en la fase de postcambio se aprecia la influencia del valor relativo de la recompensa en el CSNc, dado que la reducción en el valor de la recompensa en el grupo 32-2

indujo una marcada supresión de la conducta consumatoria, siendo esta menor que la registrada en el grupo no devaluado 2-2 a pesar de que ambos grupos recibieron en esta fase la misma concentración de sacarosa.

3.2. Histología

Dado que el presente estudio está en fase preliminar, los datos disponibles en el momento actual no permiten aún un análisis estadístico de los mismos, por lo que a continuación se presentan imágenes de la localización de las ROIs (CeA, NAc y LHb) mediante la tinción con violeta de cresilo y de su expresión de *c-fos* en la sesión de postcambio (Figura 4). Estas imágenes corresponden al cerebro de un animal representativo de cada uno de los grupos del presente experimento, tomando como referencia el atlas neuroanatómico de Paxinos y Watson (1998).





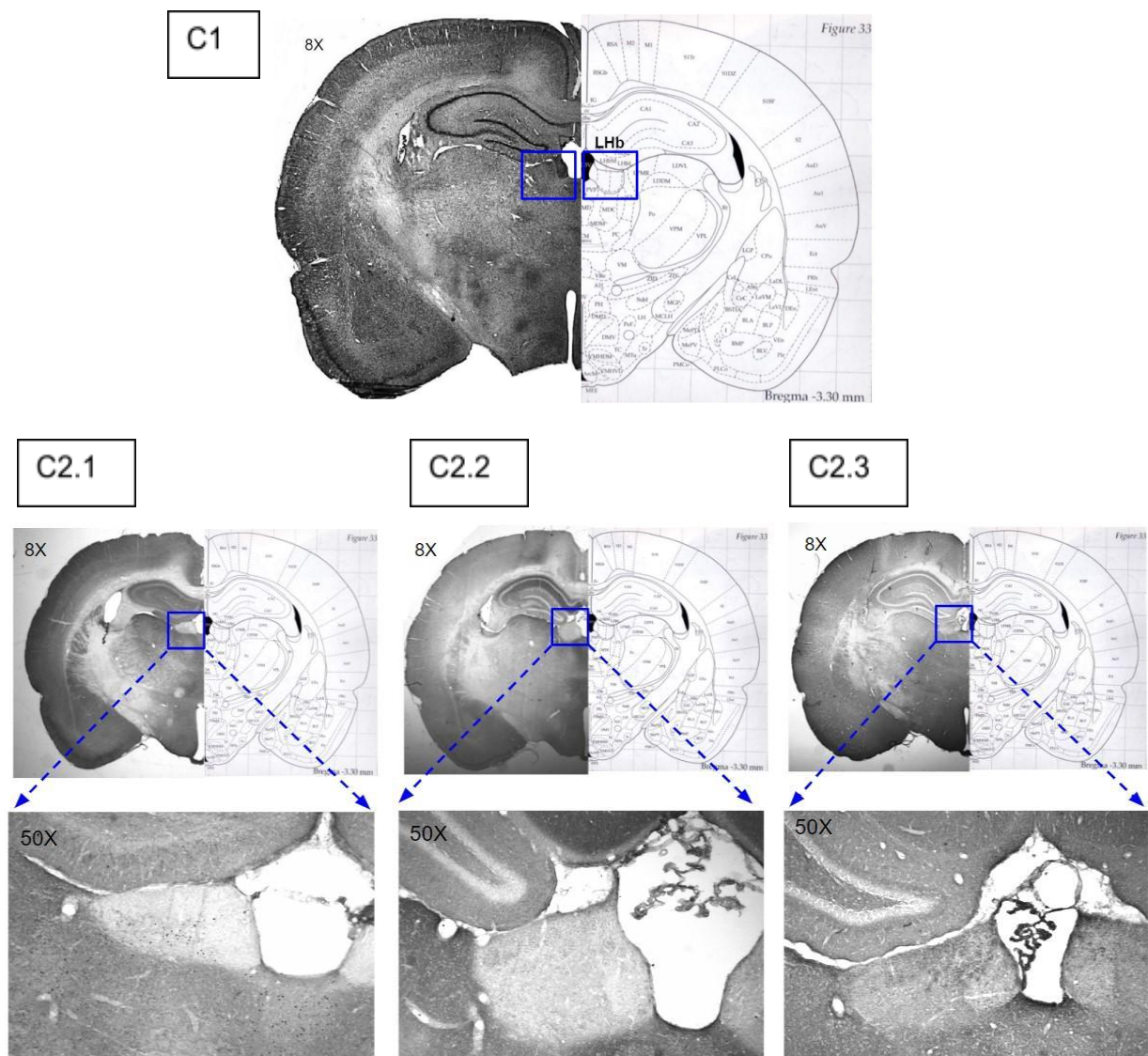


Fig. 4: Microfotografía de la localización de las ROIs a través de la tinción de violeta de cresilo (A1: CeA; B1: NAc; y C1: LHb) y de la expresión de *c-fos* de un animal representativo del grupo 32-2 (2.1), 2-2 (2.2) y 32-32 (2.3), tomando como referencia el atlas neuroanatómico de Paxinos y Watson (1998).

3. Discusión

El presente TFG tuvo como objetivo fundamental iniciar el estudio integrado del conectoma funcional de la frustración inducida mediante el CSNc a través de la cuantificación de la expresión de *c-fos* en el CeA, el NAc y la LHb, estructuras cerebrales implicadas en el componente emocional negativo resultante de dicho paradigma experimental (Ortega *et al.*, 2017).

Con respecto a los resultados comportamentales, en primer lugar, se observan diferencias de consumo de sacarosa en la fase de precambio entre los grupos, lo cual pone de manifiesto que el consumo del reforzador depende, en esta fase, de su valor absoluto, dado

que se observó un mayor consumo de las soluciones al 32% que al 2%. En segundo lugar, en la fase de postcambio se mostró el efecto típico de CSNc, por lo que se corroboran los resultados de estudios previos donde las ratas expuestas a la devaluación de una recompensa reducen significativamente su conducta consumatoria en comparación con animales no devaluados (p.ej. Flaherty, 1996).

Por otro lado, en relación con la cuantificación de la expresión de *c-fos* en las ROIs, un análisis descriptivo de los resultados preliminares parece indicar una mayor expresión de *c-fos* en los animales devaluados (32-2) en comparación con los animales de los grupos no devaluados (32-2 y 2-2) (Figura 4), un hallazgo que, de ser corroborado estadísticamente, iría en la dirección de lo obtenido en estudios previos (p.ej. Pecoraro y Dallman, 2005). En este sentido, existe evidencia sustancial de que el efecto de CSNc se acompaña de una respuesta emocional negativa que es dependiente de la activación del CeA (Ortega *et al.*, 2017; Papini *et al.*, 2015). Así, por ejemplo, existen investigaciones que han observado que la infusión intra-amigdalina de diazepam (agonista del lugar de reconocimiento para benzodiazepinas localizado en los receptores GABA_A), antes de la primera sesión de la fase de postcambio, atenúa el efecto de CSNc (Liao y Chuang, 2003).

Además, utilizando lesiones electrolíticas específicas del BLA y del CeA, otros estudios han mostrado que dichas manipulaciones inducen la disminución y eliminación, respectivamente, del efecto de contraste, presumiblemente porque el BLA estaría implicado en la comparación de la recompensa actual con el recuerdo de la recompensa esperada, mientras que el CeA sería la región amigdalina responsable de la emoción negativa resultante, la cual enviaría sus eferencias inhibitorias hacia las regiones motoras responsables de la ingesta del estímulo gustativo, promoviendo la supresión de su consumo (Becker *et al.*, 1984). En apoyo de esta afirmación, un estudio analizó la implicación de la amígdala centromedial (que incluye al CeA) en varios modelos animales relacionados con la devaluación de la recompensa y la emoción negativa (CSNc, contraste anticipatorio y campo abierto), mostrando que la inactivación reversible de dicha región amigdalina con infusiones de lidocaína (bloqueador de los canales de sodio dependientes de voltaje) redujo el efecto del CSNc y aumentó el comportamiento exploratorio en el área central de un campo abierto, no observándose efecto alguno en el contraste anticipatorio, un modelo basado en la comparación entre recompensas pero carente de componente emocional (Kawasaki *et al.*, 2015). Asimismo, mediante procedimientos aún más específicos para inhibir la actividad de la CeA (como, por ejemplo, su inactivación quimiogénica mediante DREADDs), se

observó que dicha manipulación, previa a las sesiones de postcambio, eliminó el efecto del CSNc. Este hallazgo sugeriría que la inactivación de las neuronas de la CeA redujo los efectos emocionales negativos derivados de la devaluación de la recompensa, haciendo que el comportamiento consumatorio dependiera del valor absoluto de la solución de sacarosa, más que del relativo (Guarino *et al.*, 2020).

Por lo tanto, todos estos datos reflejan la implicación del CeA en la modulación de la emoción negativa inducida por la devaluación del reforzador en el CSNc. No obstante, este subnúcleo amigdalino es modulado por otras regiones cerebrales como, por ejemplo, las ROIs elegidas en el presente TFG (NAc y la LHb), núcleos cerebrales que también han sido relacionados con el procesamiento de la emoción negativa inducida por el CSNc (Ortega *et al.*, 2017). En primer lugar, cabe destacar la proyección BLA-NAc, la cual parece estar implicada en la reducción de la liberación de dopamina en el NAc en las situaciones de devaluación de recompensa (Genn *et al.*, 2004). De hecho, existen estudios que han observado el aumento y la disminución de la liberación de DA si el valor de la recompensa es mayor o menor, respectivamente, del previsto (Matsumoto e Hikosaka, 2007). Por lo tanto, el flujo de DA en el NAc reflejaría el valor de la recompensa actual, lo cual determinaría su saliencia de incentivo, una saliencia que, a su vez, modularía la motivación para poner en marcha la búsqueda y el consumo de dicho reforzador.

No obstante, existen estudios en los que se observó que el NAc está implicado de forma diferencial en el CSNi y el CSNc, observando que las lesiones del NAc reducen el primero sin afectar al segundo (Leszczuk y Flatherty, 2000). Además, existen otros estudios que muestran que a los animales a los que se somete a un programa de reforzamiento (RF5) para obtener comida mostraban incrementos en la liberación de DA en el NAc que no se observaban cuando el animal consumía la comida *ad libitum*, por lo que este núcleo límbico parece estar implicado en la anticipación y búsqueda de recompensa, pero no en el consumo *per se* de la misma (Salamone *et al.*, 1994). Más aún, otra evidencia que apoya dicha afirmación es la observada en estudios farmacológicos de CSNi, donde se observa que, tras la infusión del cis-flupentixol (un antagonista selectivo de los receptores D1/D2) directamente en el NAc, se redujo la velocidad de la carrera por conseguir la recompensa sin afectar a la respuesta consumatoria una vez que el animal la conseguía, presumiblemente porque dichas lesiones habrían interrumpido la respuesta de aproximación a un objeto apetitivo (Leszczuk y Flatherty, 2000).

Acorde con esta idea, el NAc es uno de los componentes neurales que forma parte del sistema de recompensa cerebral responsable de la motivación que induce las conductas de búsqueda del reforzador, aunque no es una estructura necesaria para la generación de expectativas, la comparación entre recompensas o la modulación del comportamiento consumatorio (Leszczuk y Flaherty, 2000). Sin embargo, el NAc está implicado en las respuestas a las expectativas no satisfechas (Leszczuk y Flaherty, 2000), las cuales inducen la reducción de la liberación de DA, lo que explicaría la disminución de la motivación por alcanzar el incentivo cuando los animales están frustrados (Genn *et al.*, 2004).

Por otra parte, dado que el CeA también recibe una influencia moduladora adicional a través de la vía NAc-LHb, cabe destacar la importancia de la LHb en el CSNc. En efecto, esta estructura cerebral ha sido implicada en la integración y regulación de los procesos cognitivos, motivacionales y emocionales que intervienen en la pérdida o ausencia de recompensa, una función que es dependiente de sus conexiones con regiones cerebrales implicadas en el procesamiento de la recompensa absoluta, su comparación con la recompensa relativa y la emoción negativa resultante de la violación de expectativas (Donaire *et al.*, 2019). De hecho, la evidencia revisada sugiere que la LHb se activa en respuesta a la detección de errores de predicción negativos, es decir, en situaciones en las que la recompensa recibida es menor de la esperada (Matsumoto e Hikosaka, 2007). Se argumenta, así, que una de las consecuencias de la activación de la LHb sería la inhibición, en última instancia, de las neuronas dopaminérgicas del sistema de recompensa, dadas las conexiones inhibitorias directas e indirectas (a través del núcleo tegmental rostromedial -RMTg-) entre la región habenuar y el ATV (que proyecta, a su vez, al NAc). De acuerdo con esta idea, se ha comprobado que la estimulación eléctrica de la LHb reduce la liberación de DA en el VTA en respuesta a la presentación de una recompensa, apoyando la idea de que las neuronas de la LHb y del VTA responden a los reforzadores con patrones de actividad opuestos (Matsumoto e Hikosaka, 2007). De este modo, ante la violación de una expectativa de recompensa se desencadenaría una emoción negativa que sería dependiente, en parte, de la activación de la LHb, la cual, a su vez, disminuiría el flujo de DA en el NAc. Todo ello reduciría la saliencia de incentivo de la recompensa, promoviendo la disminución de la motivación por su búsqueda.

La naturaleza emocional negativa de las experiencias de devaluación de recompensa queda patente, por otro lado, en estudios en los que se ha comprobado que dichas experiencias promueven el consumo voluntario de sustancias ansiolíticas como forma de

automedicación emocional (Torres y Papini, 2016). Así, por ejemplo, Manzo *et al.* (2015) observaron un aumento transitorio en el consumo de estas sustancias (en concreto, alcohol y clordiazepóxido) en los animales devaluados en un modelo de CSNc, presumiblemente porque estos ansiolíticos reducían la intensidad de la frustración inducida por la reducción de la recompensa. Esta conducta de automedicación emocional se iniciaría y mantendría por el reforzamiento derivado de la reducción del afecto negativo provocado por la pérdida inesperada del reforzador (Donaire *et al.*, 2022). En este sentido, la correlación entre las experiencias de pérdida de recompensa y el consumo de sustancias de abuso está avalada por varios estudios clínicos realizados en población clínica aquejada de trastornos de ansiedad y/o de uso de sustancias (Donaire *et al.*, 2022; Torres y Papini, 2016). Este efecto atenuador de la frustración se explicaría por el solapamiento de los circuitos cerebrales y sistemas neuroquímicos implicados en ambos fenómenos, un solapamiento que podría explicar cómo la pérdida de recompensa puede aumentar la vulnerabilidad a desarrollar un trastorno por consumo sustancias de abuso y por qué una persona adicta es más reactiva a una experiencia de pérdida o cualquier experiencia que conlleve frustración (Ortega *et al.*, 2017). El hecho de que las ROIs revisadas en este TFG estén implicadas no sólo en la frustración sino, además, en la conducta adictiva, permite sugerir una estrecha conexión entre dichas regiones, el procesamiento de la pérdida de incentivos, y la regulación de las consecuencias comportamentales derivadas de dicha pérdida (entre ellas, el consumo de sustancias con efectos ansiolíticos).

Para finalizar, el presente TFG pone de manifiesto la importancia de continuar avanzando, a través del empleo de modelos animales, en el estudio psicobiológico del conectoma neuronal de la frustración, un estudio que sin duda aportará conocimientos de relevancia sobre la relación entre las emociones negativas derivadas de la pérdida de recompensa y el consumo de sustancias adictivas, y que guiará el desarrollo de posibles intervenciones para mejorar la prevención y el tratamiento de los trastornos por consumo de sustancias de abuso en humanos.

Referencias

- Amsel, A. (1992). *Frustration theory*. Cambridge University Press.
- Amsel, A. (1994). Precis of frustration theory: An analysis of dispositional learning and memory. *Psychonomic Bulletin and Review* 1, 280–296.
<https://doi.org/10.3758/BF03213968>
- Becker, H. C., Jarvis, M. F., Wagner, G. C. y Flaherty, C. F. (1984). Medial and lateral amygdectomy differentially influences consummatory negative contrast. *Physiology & behavior*, 33(5), 707–712.
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(84\)90035-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(84)90035-0)
- Berkowitz, L. (1989). Frustration-aggression hypothesis: Examination and reformulation. *Psychological Bulletin*, 106(1), 59–73.
<https://doi.org/10.1037/0033-2909.106.1.59>
- Curran, T., Bravo, R. y Müller (1985). Transient induction of *c-fos* and *c-myc* in an immediate consequence of growth factor stimulation. *Cancer surveys*, 4(4), 655–681.
- Dollard, J., Miller, N. E., Doob, L. W., Mowrer, O. H. y Sears, R. R. (1939). *Frustration and aggression*. Yale University Press.
<https://doi.org/10.1037/10022-000>
- Donaire, R., Cándido, C., Papini, M. R. y Torres, C. (2022). Frustrative nonreward and emotional self-medication: Factors modulating alcohol consumption following reward downshift in rats. *Physiology & behavior*, 245, 113688.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113688>
- Donaire, R., Morón, I., Blanco, S., Villatoro, A., Gámiz, F., Papini, M. R. y Torres, C. (2019). Lateral habenula lesions disrupt appetitive extinction, but do not affect voluntary alcohol consumption. *Neuroscience Letters*, 703(11), 184–190.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.03.044>
- Flaherty, C. F. (1996). *Incentive relativity*. Cambridge University Press.
- Flaherty, C. F. y Leszczuk, M. H. (2000). Lesions of nucleus accumbens reduce instrumental but not consummatory negative contrast in rats. *Behavioural Brain Research*, 116(1), 61–79.
[https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(00\)00265-5](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(00)00265-5)

- Freud, S. (1958). "Types of Onset of Neurosis". En J. Strachey (Ed.), *The Standard Edition of the Complete Psychological Works of Sigmund Freud* (Vol. 12, pp. 227-230). London: Hogarth Press.
- Genn, R. F., Ahn, S. y Phillips, A. G. (2004). Attenuated dopamine efflux in the rat nucleus accumbens during successive negative contrast. *Behavioral Neuroscience*, 118, 869-973. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.4.869>
- Glueck, A. C., Dennis, T. S., Perrotti, L. I., Torres, C. y Papini, M. R. (2015). Brain expression of pCREB in rats exposed to consummatory successive negative contrast. *Neuroscience Letters*, 587, 93-97. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.12.036>
- Gray, J. A. (1987). *The psychology of fear and stress*, 2nd ed. Cambridge University Press.
- Guarino, S., Conrad, S. E. y Papini, M. R. (2020). Frustrative nonreward: Chemogenetic inactivation of the central amygdala abolishes the effect of reward downshift without affecting alcohol intake. *Neurobiology of Learning & Memory*, 169, Article 107173. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107173>
- Kawasaki, K., Glueck, A. C., Annicchiarico, I. y Papini, M. R. (2015). Function of the centromedial amygdala in reward devaluation and open-field activity. *Neuroscience*, 303, 73-81. <https://personal.tcu.edu/papini/15KawasakiN.pdf>
- Kovacs, K. J. (1998). c-Fos as a transcription factor: A stressful (re)view from a functional map. *Neurochemistry International*, 33, 287-297. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(98\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(98)00023-0)
- Krutsay, M. (1970). Nissl staining with cresyl violet. *Zeitschrift für Medizinische Labortechnik*, 11(2), 75-6. <https://europepmc.org/article/med/4193916>
- Liao, R. M. y Chuang, F. J. (2003). Differential effects of diazepam infused into the amygdala and hippocampus on negative contrast. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 74(4), 953-960. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(03\)00023-6](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(03)00023-6)
- Manzo, L., Donaire, R., Sabariego, M., Papini, M. R. y Torres, C. (2015). Anti-anxiety self-medication in rats: Oral consumption of chlordiazepoxide and ethanol after reward devaluation. *Behavioural Brain Research*, 278, 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.017>

- Rosenzweig, S. (1934). Types of reaction to frustration. *The Journal of Abnormal and Social Psychology*, 29(3), 298-300. <https://doi.org/10.1037/h0073674>
- Salamone, J.D., Cousins, M.S. y Bucher S. (1994) Anhedonia or anergia? Effects of haloperidol and nucleus accumbens dopamine depletion on instrumental response selection in a T-maze cost/benefit procedure. *Behavioural Brain Research*, 65, 221–9. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90108-2](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90108-2)
- Ortega, L. A., Glueck, A. C., Uhelski, M., Fuchs, P. N. y Papini, M. R. (2013). Role of the ventrolateral orbital cortex and medial prefrontal cortex in incentive downshift situations. *Behavioural Brain Research*, 244, 120-129. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.01.029>
- Ortega, L. A., Solano, J. L., Torres, C. y Papini, M.R. (2017). Reward loss and addiction: Opportunities for cross-pollination. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 154, 39-52. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.02.001>
- Ortega, L.A., Uhelski, M., Fuchs, P.N. y Papini, M.R. (2011). Impairment of recovery from incentive downshift after lesions of the anterior cingulate cortex: emotional or cognitive deficits? *Behavioral Neuroscience*, 125(6), 988–995. <https://doi.org/10.1037/a0025769>
- Papini, M. R. (2003). Comparative psychology of surprising nonreward. *Brain, Behavior and Evolution*, 62, 83-95. <https://doi.org/10.1159/000072439>
- Papini, M. R., Wood, M., Daniel, A. M. y Norris, J. N. (2006). Reward loss as psychological pain. *International Journal of Psychology and Psychological Therapy*, 6(2), 189-213. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=56060205>
- Papini, M. R., Fuchs, P. N. y Torres, C. (2015). Behavioral neuroscience of psychological pain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 48, 53-69. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.11.012>
- Papini, M.R., Guarino, S., Hagen, C. y Torres, C. (2022). Incentive disengagement and the adaptive significance of frustrative nonreward. *Learning & Behavior*, <https://doi.org/10.3758/s13420-022-00519-3>
- Papini, M. R. y Torres, C. (2017). Comparative learning and evolution: Reward loss. In J. Call (Ed.), *APA handbook of comparative psychology, Vol II* (pp. 267-286). American Psychological Association.
- Paxinos, G. y Watson, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic press, New York.

- Pecoraro, N. y Dallman, M. F. (2005). C-Fos after incentive shifts: expectancy, incredulity, and recovery. *Behavioral Neuroscience*, 119, 366-387. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.119.2.366>
- Pecoraro, N., de Jong, H. y 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. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.12.018>
- Torres, C. y Papini, M. R. (2016). Emotional self-medication and addiction. En V.R. Preedy (Ed.), *The Neuropathology Of Drug Addictions And Substance Misuse*, Vol I (pp. 71-81). Elsevier Inc.
- Torres, C., y Papini, M. R. (2017). Incentive relativity. En: Vonk J. y Shackelford T. K. (Eds.), *Encyclopedia of animal cognition and behavior* (pp. 1-13). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_1079-1
- Torres, C. y Papini, M. R. (en prensa). Comparative psychology of frustrative nonreward. En L. Al-Shawaf y T. Shackelford (Eds.), *The Oxford Handbook of Evolution and the Emotions*. Oxford University Press.
- Torres, C., Morillo-Rivero, L., Donaire, R. y Papini, M. R. (en revisión). Frustración: De la vida real al laboratorio (y viceversa). En Varios (Eds.), *Neurociencia del Comportamiento: del laboratorio a la vida real*.
- Torres, C., Morillo-Rivero, L. y Papini, M. R. (2021). Cuando la pérdida duele: bases biológicas de la frustración. *Revista Interamericana de Psicología/ Interamerican Journal of Psychology*, 55(1), e1443. <https://doi.org/10.30849/ripijp.v55i2.1443>