



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE HUMANIDADES Y
CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE
PSICOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

CORRELATOS GENÉTICOS Y
CONDUCTUALES DE LA FRUSTRACIÓN.
ESTUDIOS CON RATAS ROMANAS DE ALTA
(RHA-I) Y BAJA- (RLA-I) EVITACIÓN

PRESENTADA POR:
MARTA SABARIEGO ALMAZÁN

DIRIGIDA POR:
DRA. DÑA. CARMEN TORRES BARES
DR. D. IGNACIO MORÓN HENCHE

JAÉN, 18 DE SEPTIEMBRE DE 2013

ISBN 978-84-8439-854-7



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación

Departamento de Psicología

Área de Psicobiología

Correlatos Genéticos y Conductuales de la Frustración

Estudios con Ratas Romanas de Alta (RHA-I) y Baja (RLA-I) Evitación

TESIS DOCTORAL

Marta Sabariego Almazán

Tesis Doctoral dirigida por:

Dra. Carmen Torres Bares (*Universidad de Jaén*)

y Dr. Ignacio Morón Henche (*Universidad de Granada*)

AGRADECIMIENTOS

Una de las cosas más difíciles cuando uno hace una película es la edición, ese momento en el que toca elegir qué escenas mostrar al público y cuáles dejar anónimas perdidas en el recuerdo de los que tuvieron la suerte de vivirlas. Creo que la sección de “agradecimientos” de una Tesis se parece mucho a eso. Resulta imposible plasmar en unas pocas páginas 4 años de experiencias, de risas y lágrimas, de historias y lecciones aprendidas y por aprender; en definitiva 4 años de vida.

El tráiler de mi película empieza con mis padres. Quiero darles las gracias por creer siempre en mí, por querer siempre que estudiara incluso cuando más falta hacía una ayuda económica en casa. Gracias mamá por quererme y aceptarme siempre como soy, por hacerme las mejores comidas cuando estaba estudiando, por no enfadarte conmigo porque mi habitación siempre parece “un cuartel robado”, por ayudarme y cuidarme siempre...por ser la mejor madre del mundo y la persona más importante en mi vida. Gracias papá por regalarme aquella Navidad “Micronova” cuando yo quería “Alfanova”, gracias por convertir la serie “Érase una vez el cuerpo humano” en mis dibujos favoritos, por llevarme a ver estrellas y hablarme del Universo, en definitiva por hacerme curiosa.

Gracias a mi abuela M^aLuisa, que me ha dado casa y cariño todos estos años, me ha hecho su delicioso salmorejo hasta en invierno, me ha aguantado y entendido, y me ha contado los mejores chistes de mi repertorio.

Gracias a mis hermanos: Manolin, mi herManu, mi ojito derecho, mi compañero de piso y de vida; Antoñin, que siempre ha estado ahí cuando

de verdad lo he necesitado y me ha enseñado a entender otros puntos de vista; agradezco a Zaida, mi curricurra su simple y perfecta existencia, sus mensajes de apoyo constante y que me hablara de filósofos y artistas para ayudarme a desconectar; y gracias a mi pequeña Cristina por la gran fuerza que siempre me transmite, que siendo la más chica es la más grande.

Gracias a toda mi familia, porque absolutamente todos me habéis demostrado que no existen los parientes lejanos si uno no quiere. Gracias en especial a mi prima y amiga Paola, por convencerme para salir sólo un ratillo y contarme todo lo que me había perdido para que no me sintiera nunca excluida.

Gracias a todos mis amigos, sois muchísimos...pero quiero agradecerlos a todos vuestra comprensión, apoyo y ayuda. Gracias Isabel, por ser mi primera y más especial amiga, por hacer que nunca me sintiera rara haciendo tonterías e inventando mundos paralelos donde jugar. Gracias Iris, por traer el arte a mi vida, por estar siempre, por regalarme tu creatividad al diseñar la portada de mi Tesis, por tomártelo como si fuera para ti, por todo. Gracias Ozge, por los viajes improvisados a los lugares más especiales, por tener siempre un consejo para mí y el tiempo para dármelo. Gracias Ana, por mostrarte siempre interesada en todo lo que cuento de mis experimentos, por querer aprender conmigo y enseñarme tanto en nuestras conversaciones.

Gracias a todos mis compañeros de la Universidad de Jaén. A todos los miembros del grupo de investigación HUM-642. En especial agradezco a Juan Manuel Rosas su valiosa ayuda durante todo el proceso de realización de mi Tesis, así como sus consejos y sugerencias. Gracias a José Enrique Callejas por ser tan “APAñado” y ayudarme tanto con el formato y la

revisión de mi Tesis, incluso cuando las dudas me surgían un viernes por la noche. Agradezco a Manuel Miguel Ramos que me regalara una banda sonora para los últimos momentos de escritura de esta Tesis, cuando las fuerzas flaqueaban y tanto lo necesitaba. Agradezco también a Francisco J. Esteban sus comentarios y paciencia conmigo mientras analizábamos datos genéticos. Gracias a María José Gómez y Lourdes de la Torre por enseñarme a dar mis primeros pasos en la investigación. Agradezco a Lucas Cuenya y Rocío Donaire y Gema Cantero todos esos momentos compartidos entre ratas en el laboratorio y en la cafetería de la Uni, son muchas las historias que he vivido con vosotros y que siempre estarán en mi memoria. Gracias a Lidia, por venir desde Méjico y traer esa dulzura cada día al laboratorio, y a Pepi por ser la mejor técnico que uno podría tener. Y por supuesto gracias a las ratas Romanas, sin ellas nada de esto estaría pasando.

También quiero agradecer a Encarnación Ramírez, mi Nani, su continuo interés y toda la ayuda durante estos años, no solo de Tesis sino de vida, es por ella que sentí curiosidad por lo que hoy es mi vocación, la Psicología.

En cuanto a mis compis del despacho, ha sido increíble poder encontrar una afinidad tan grande con la gente que trabajas, muchas veces quería que pasara el fin de semana rápido para volverles a ver entrar por la puerta. Gracias a Alex por estar disponible para ayudar siempre, por convertirse rápido en un amigo y dejarme su mesa haciéndome así conocer a quienes ahora son también mis amigos: Lourdes y sus modelos llenos de inspiración; Teresa y su maletín de visitadora médica; Rocío y el cuidado de su maceta; Nela, Samuel y Juan Antonio que aunque con ellos mi tiempo en el despacho ha sido breve han tenido siempre una sonrisa que regalar...y mis Lewins!!! Marta, Virginia, María y Cristina, mis amigas del alma, con

quienes he reído y llorado (de la risa), con quienes he compartido incluso un incendio...

Doy las gracias también a Mauricio Papini por sus sugerencias y valiosa ayuda en la realización de este trabajo. Gracias a Alberto Fernández-Teruel y todo su super equipo de Barcelona por esa grandiosa estancia en la que en la que aprendí muchísimas cosas y en la que además de investigar tuvimos tiempo para reír.

Mi película continúa en Italia, en la Universidad de Cagliari, concretamente en el laboratorio de Elio Acquas. A él quiero agradecerle la confianza que me brindó trabajando allí, todo lo que me enseñó acerca de química farmacéutica sin dudar ni un solo día que yo pudiera hacerlo. Agradezco asimismo a Osvaldo Giorgi y Magi Corda su ayuda y disponibilidad durante mis estancias, todas las posibilidades que me brindaron para aprender cosas interesantes también fuera de los experimentos que realizamos. Gracias a Michela Rosas por su paciencia y cariño enseñándome cada paso de la técnica de inmunohistoquímica. Gracias Francesca Congiu por esas escapadas y los almuerzos con vistas al mar en la terraza secreta del “palazzo delle science”. A Valentina Giugliano por ser la mejor amiga que tengo en Cerdeña, por todas nuestras aventuras y las risas que hemos compartido, por convertirse “nella mia sorella italiana”.

Por otro lado, quiero dar las gracias a toda la gente que me ayudó tantísimo durante mi última estancia en el “Center for the neurobiology of learning and memory” en California, Irvine. Un especial agradecimiento va para Nan Collett, quien me acogió en su casa y me acompañó cada día al laboratorio, me cocinó cada noche las más especiales cenas y se convirtió

en una persona increíblemente especial para mí. Gracias al Dr. Weinberger por aceptarme en su laboratorio, por enseñarme a ser más crítica, a pensar mejor y por su inmensa amabilidad. Gracias al Dr. McGaugh por toda la ayuda que me dio y me sigue brindando, por ser siempre tan agradable conmigo. Gracias al Dr. Guzowski por las sugerencias y comentarios para mis experimentos, así como por la cordialidad que mostró al explicarme su investigación. Quiero también agradecer a Kasia Bieszczad todo lo que me enseñó acerca de Matlab siempre con una sonrisa incluso en los momentos más frustrantes. Gracias a Jacqui Weinberger, Julia Piasis y Lori Metherate su atención y gentileza. Por último, y no por ello menos importante, quiero agradecer a Matt y Jeff Collett, que junto con Nan Collett, me han hecho sentir como en “mi casa”, las risas compartidas y todas las películas que hemos visto juntos. Gracias a Jeff también por su ayuda en la distancia, por la motivación que ha supuesto cada día durante esta recta final, por aparecer en mi vida y quedarse a caminar conmigo.

Y mi final de cine lo dibujan Ignacio Morón y Carmen Torres, mis directores de Tesis, gracias a ellos este sueño se está haciendo realidad. Gracias Nacho por tu refuerzo continuo, por saber hacer siempre énfasis en lo que hago bien en tus correcciones, por tu entusiasmo y dedicación. Gracias Carmen por además de mi directora ser mi amiga, por estar ahí hasta en los peores momentos, por tu implicación y tu confianza, por ayudarme siempre, por ser como eres...que no puede ser mejor.

Pero un tráiler no es la película completa, por eso quiero pedir disculpas a todos aquellos que no están entre estas páginas, decirles que sí que lo están en mi mente y mis recuerdos, y que me encantaría que siguieran acompañándome, construyendo nuevas aventuras y recuerdos.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación recibida por parte de Fundación Maratón de TV3 (ref. 092630/31).

*A todos aquellos que, entre tanta neurona, han
sido capaces de descifrar mi alma.*

LISTA DE ABREVIATURAS

5HT3: receptores de serotonina;
ACE: angiotensin I-converting enzyme ACTH: adrenocorticotropic hormone;
ADHD: Attention-deficit hyperactivity disorder;
ADN: ácido desoxirribonucleico;
ADNc: ADN complementario;
ANOVA: análisis de la varianza;
ARN: ácido ribonucleico;
Camk2d: calcium/calmodulin-dependentproteinkinase II, delta;
CaMKII: complejo actina-atinina;
CAMKK2: calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta;
CaMKs: CaM Kinasas;
cDNA: complementary DNA;
CGH: comparative Genome Hybridization;
CRF: hormona liberadora de corticotropina;
CRHBP: corticotropin releasing hormone binding protein;
cRNA: complementary RNA;
CSN: Contraste sucesivo negativo;
cSNC: Consummatory successive negative contrast;
CSNc: Contraste sucesivo negativo consumatorio;
CSNi: Constraste sucesivo negativo instrumental;
Cx30: astrocyte-specific connexin-30;
D2: receptor D2 de la dopamina;
DNA: deoxyribonucleic acid;
EPHX2: epoxide hydrolase 2, cytoplasmic;
ERPC: Efecto del refuerzo parcial en el contraste;
ERPCC: Efecto del refuerzo parcial en el contraste consumatorio;

ERPCi: Efecto del refuerzo parcial en el contraste instrumental;
ERPE: Efecto del refuerzo parcial en la extinción;
FC: fold change;
FCR1: cromosoma X frágil;
FDR: false discovery rates;
GABA: ácido gamma-aminobutírico;
GABA_A: GABARAP;
HHA: eje hipotálamo-hipófisis-adrenal;
HOMER3: homer homolog 3 (Drosophila);
HPA: hypothalamic-pituitary-adrenal axis;
HT2C: 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor;
IPA: Ingenuity Pathways Analysis platform;
iSNC: Instrumental successive negative contrast;
MAP: proteína microtubular asociada;
MAPK: vía MAP kinasas;
MMLV: moloney-murine leukaemia virus;
MNR: Maudsley non reactive rat strain;
MOBP: myelin-associated oligodendrocytic basic protein;
MOBP: myelin-associated oligodendrocytic basic protein;
MR: Maudsley reactive rat strain;
MREE : Magnitude of reinforcement extinction effect;
N/Nih-HS: heterogeneous rat stock;
Nanos1: uncharacterised protein (source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:D4A1F8);
NDN: necdin homolog (mouse);
OSP: oligodendrocyte-specific protein;
OSP: oligodendrocytic-specific protein;
PEA: phenylethilamina/feniletilamina;
Pkd211: polycystic kidney disease 2-like 1;

PLP: proteolipid protein;
PLP: proteolipid protein;
Ppm1m: proteinphosphatase 1M;
PRCE: Patial reinforcement contrast effect;
PREE: Partial reinforcement extinction effect;
PRL: prolactina;
Psors1c2: psoriasis susceptibility 1 candidate 2;
qRT-PCR: Reacción en cadena de lapolimerasa con transcriptasa inversa ó
quantitative polymerase chain reaction;
QTL: quantitative Trait Loci;
Rgls2h: regulator of G-protein signaling like 2 homolog;
RHA/Verh: Roman High-Avoidance Outbred rat strain;
RHA-I: Roman High-Avoidance Inbred rat strain;
RLA/Verh: Roman Low-Avoidance Outbred rat strain;
RLA-I: Roman Low-Avoidance Inbred rat strain;
RNA: ribonucleic acid;
RPL6: ribosomal protein L6;
SAC: sistema de activación conductual;
Sfrs6: splicing factor, arginine/serine-rich 6;
SHA: Syracuse High-Avoidance;
SHS: sistema septohipocámpico;
SIC: sistema de inhibición conductual;
SLA: Syracuse Low-Avoidance rat strain;
Slc35d3: V solute carrier family 35, member D3;
SNC: Successive negative contrast rat strain;
SP: Sprague-Dawley rat stock;
Sytl2: synaptotagmin-like 2;
Taar2: trace amine-associated receptor 2;

TDAH: Trastorno de déficit de atención con hiperactividad;

Thap1: THAP domain containing, apoptosis associated protein 1;

WKY: Wistar Kyoto rat strain;

*"The night is darkest just before the dawn.
And I promise you, the dawn is coming"*

Harvey Dent.

ÍNDICE/INDEX

1. RESUMEN	19
2. EXTENDED SUMMARY	21
A. ABSTRACT	21
B. STATE OF ART	22
C. GOALS AND HYPOTHESES	28
D. SUMMARY OF EXPERIMENTAL STUDIES	30
E. DISCUSSION	61
3. INTRODUCCIÓN	65
4. ANTECEDENTES	69
A. APROXIMACIÓN PSICBIOLÓGICA AL CONCEPTO DE EMOCIÓN	69
B. EMOCIONES NEGATIVAS: MIEDO Y ANSIEDAD	77
C. MODELOS ANIMALES DE ANSIEDAD	81
D. LÍNEAS DE RATAS ENDOCRIDADAS EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DE LA FRUSTRACIÓN	95
5. TÉCNICA DE <i>MICROARRAY</i> EN EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL	111
6. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	125
A. OBJETIVOS	125
B. HIPÓTESIS	126
7. RESUMEN Y DISCUSIÓN DE LOS ESTUDIOS EXPERIMENTALES	129
A. METODOLOGÍA GENERAL	129
B. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DEL EFECTO DEL REFUERZO PARCIAL EN EL CONTRASTE SUCESIVO NEGATIVO	141
C. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN HALLADA EN RATAS ROMANAS EN CONDICIONES BASALES	151
D. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL HALLADA EN HIPOCAMPO TRAS UNA EXPERIENCIA DE FRUSTRACIÓN (CSNI) EN RATAS ROMANAS	161
8. DISCUSIÓN GENERAL	171
9. CONCLUSIONES	187
10. REFERENCIAS	189
11. ANEXOS: ARTÍCULOS CIENTÍFICOS	235

1. RESUMEN

Las experiencias de pérdida de recompensa constituyen una de las principales fuentes de estrés emocional a las que se enfrenta el ser humano a lo largo de su vida (Kamenetzky et al., 2009). En el laboratorio animal, la omisión o devaluación inesperada de un reforzador desencadena un estado fisiológico, cognitivo y comportamental denominado frustración (Amsel, 1992). Este estado involucra mecanismos emocionales semejantes a los inducidos por la presentación de otros estímulos aversivos, desencadenando respuestas análogas al estrés a través de la activación de circuitos cerebrales vinculados con el miedo y la ansiedad (Gómez, Morón et al., 2009) como por ejemplo la inhibición de la conducta en curso (tanto la consumatoria como la instrumental), agresión, escape o activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA; Díaz-Morán et al., 2012; Gómez, Escarbal et al., 2009; Rosas et al., 2007; Torres et al., 2005). Si bien esta hipótesis ha sido apoyada por numerosos estudios conductuales, farmacológicos, hormonales y neuroanatómicos (Gómez, Morón et al., 2009; Mustaca y Papini, 2005), son escasos los trabajos que se han interesado por estudiar las bases neurogenéticas de la frustración (Cuenya, Gómez, Sabariego, Mustaca, y Torres, 2011). La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo fundamental analizar los correlatos conductuales y genéticos de la frustración en dos cepas de animales seleccionadas en función de sus diferencias extremas en el aprendizaje de evitación activa: las ratas Romanas consanguíneas de Alta (RHA-I) y Baja Evitación (RLA-I). Como consecuencia de esta selección, estas cepas presentan claras diferencias en el rasgo conductual de ansiedad o reactividad emocional, siendo éste alto en la cepa RLA-I, y bajo en la cepa RHA-I. En concreto, se pretende extender el fenotipado conductual de estos sujetos en situaciones de frustración (efecto del reforzamiento parcial sobre el contraste, ERPC),

identificando al mismo tiempo aquellos genes cuya expresión diferencial podría subyacer a las diferencias conductuales registradas en las ratas Romanas en este tipo de situaciones (contraste sucesivo negativo instrumental, CNSi). Se parte de la hipótesis de que la cepa más reactiva emocionalmente (RLA-I) mostrará respuestas de frustración más acentuadas que la cepa menos reactiva emocionalmente (RHA-I), y que estos hallazgos conductuales se relacionarán con diferencias en la expresión de genes vinculados con respuestas de ansiedad y estrés, tanto en el cerebro completo como, sobre todo, en regiones específicas, como el hipocampo. Los resultados corroboraron estas hipótesis, dado que la cepa RLA-I mostró un ERPC y un CSN instrumentales que no fueron observados en la cepa RHA-I (estudios 1 y 3). Al mismo tiempo, se hallaron diferencias significativas entre las cepas en la expresión de numerosos genes, tanto en el cerebro completo en condiciones basales (CAMKK2, CRHBP, EPHX2, HOMER3, PRL y RPL6), como en el hipocampo tras una experiencia en devaluación de recompensa (CSNi; TAAR2, THAP1, PKD2L1, NANOS). Estos genes están relacionados con funciones neurales y comportamentales diversas, muchas de las cuales son divergentes entre las ratas Romanas (tales como miedo, estrés, ansiedad, búsqueda de novedad, esquizofrenia, depresión y adicción a drogas), mostrando así la utilidad de las ratas Romanas en la investigación neurogenética de la frustración. Estos resultados, así como las limitaciones y las perspectivas futuras que de ellos se derivan, se discuten en profundidad a lo largo esta Tesis Doctoral.

Genetic and Behavioral Correlates of Frustration:

Studies with Roman High (RHA-I) and Low (RLA-I) Avoidance Rats.

2. EXTENDED SUMMARY

A. ABSTRACT

Reward loss experiences are among the main sources of emotional stress that humans have to face throughout their lives (Kamenetzky et al., 2009). In the animal laboratory, it has been repeatedly shown that the unexpected omission or devaluation of a reinforcer triggers a physiological, cognitive, and behavioral state called frustration (Amsel, 1992). This state involves emotional mechanisms that resemble those unleashed by the presentation of other aversive stimuli, inducing similar stress responses through the activation of brain circuits involved in fear and anxiety (Gómez, Morón et al., 2009). Although this hypothesis has been supported by behavioral, pharmacological, hormonal, and neuroanatomical evidence (Gómez, Morón et al., 2009; Mustaca & Papini, 2005), only a few studies have focused on the neurogenetic basis of frustration in animals (Cuenya, Gómez et al., 2011). Toward that goal, the present dissertation analyze the behavioral and genetic correlates of frustration in two strains of animals selected on the basis of their extreme differences in active avoidance learning: The inbred Roman High- (RHA-I) and Roman Low- Avoidance (RLA-I) rats. As a consequence of this selection, Roman rats differ behaviorally in situations inducing fear and anxiety, with RLA-I rats showing higher emotional reactivity than RHA-I rats. To this aim, I first extended the behavioral phenotyping of Roman rats to a frustrating situation: the partial reinforcement contrast effect (PRCE). Second, I

identified some genes whose differential brain expression could underlie strain differences observed in the instrumental successive negative contrast paradigm SNCi. Given the higher emotional reactivity characterizing the RLA-I strain as opposed to the RHA-I strain, it was predicted that (1) the former would show more pronounced frustration responses compared to the latter, and (2) these behavioral differences would correlate with divergence in the expression of genes linked to anxiety, fear, and stress, in the whole brain as well as in specific brain areas, such as the hippocampus. Genes differentially regulated in the whole brain under basal (resting) conditions (CAMKK2, CRHBP, EPHX2, HOMER3, PRL y RPL6) were identified. These genes are related to fearfulness, novelty seeking, impulsivity and vulnerability to drug abuse. Additional genes in the hippocampus are also expressed after a situation of reward devaluation (TAAR2, THAP1, PKD2L1, NANOS), with relevance in schizophrenia, depression, anxiety, and drug addiction. These results show the usefulness of Roman strains for neurogenetic research of frustration.

B. STATE OF ART

Surprising reward loss experiences are among the major sources of emotional stress and conflict that humans have to face throughout their life. The death of a close relative, illness, or unemployment, among others events, can trigger behavioral, hormonal, and physiological responses, and lead to emotional disorders (Kamenetzky et al., 2009; Papini, Wood, Daniel, & Norris, 2006). Animal models provide a useful approach to study reward loss from a psychobiological perspective. Moreover, animal research enables a careful manipulation and control of the environment, and a systematic recording of the responses induced by reward loss. Animal

models contribute to understanding the causes of these emotional disorders and suggest possible therapeutic interventions.

A large body of evidence obtained in the animal laboratory suggests that the downshift in the quality or quantity of a previously presented appetitive reinforcer triggers a physiological, cognitive, and behavioral state called frustration (Amsel, 1992), disappointment, (Flaherty, 1996), anxiety, (Gray, 1987) or psychological pain (Papini et al., 2006). This aversive state involves emotional mechanisms similar to those induced by the presentation of aversive stimuli (e.g., punishment, physical pain, or novelty; Dantzer, 1987), inducing stress responses through the activation of brain circuits involved in fear and anxiety (Gómez, Morón et al., 2009; Papini & Dudley, 1997). Successive negative contrast (SNC), appetitive extinction, the magnitude of reinforcement extinction effect (MREE), the partial reinforcement extinction effect (PREE), and the partial reinforcement contrast effect (PRCE) are some animal tests of reward downshift extensively used to explore the behavioral, pharmacological, neuroanatomical, and neuroendocrine basis of frustration.

The main goal of this dissertation was to extend the analysis of the psychobiological basis of frustration to a neurogenetic perspective. To this aim, animals showing extreme divergence in avoidance learning, which also led to divergence in anxiety or emotional reactivity, were used: the Roman High- (RHA) and Low- Avoidance (RLA) strains of rats. These strains were selected since the 1960s for their good (RHA) or poor (RLA) ability to acquire a two-way active avoidance response (Driscoll & Bättig, 1982). The reproduction and maintenance of these strains has continued since 1993 at the Autonomous University of Barcelona (Spain), leading to the inbred varieties called RHA-I and RLA-I, respectively. Many

experimental studies have shown that, as a result of this psychogenetic selection, both outbred and inbred strains differ in their emotional reactivity in a variety of situations: RLA-I rats show a more pronounced response when exposed to anxiety tests related to conflict and innate fear. For example, RLA rats exhibit greater shock-induced drinking suppression in the Vogel conflict test in comparison to RHA-I rats (Ferré et al., 1995). Similar results (more behavioral inhibition in RLA-I rats vs. RHA-I rats) are found when the animals are exposed to anxiogenic situations related to novelty and exploration, such as the open field (Fernández-Teruel et al., 1992), the hole board (Fernández-Teruel, Escorihuela, Castellano, González, & Tobeña, 1997), and the light/dark box (Thierry & Peter, 2003). In addition, RLA-I rats show higher rates of unconditioned and conditioned fear responses (e.g., defecation, freezing, grooming, startle response, passive avoidance) than RHA-I rats (Escorihuela et al., 1999; Fernández-Teruel, Giménez-Llort et al., 2002; López-Aumatell et al., 2009; Steimer & Driscoll, 2005; Thierry & Peter, 2003). However, there are contradictory results when using other tests of anxiety, such as the elevated plus-maze, the successive alley or the mobility test, given that the expected greater tendency of RHA-I rats to explore open and novel spaces is not always observed in these tests (for review see Escorihuela et al., 1999); unpublished results from our laboratory).

In addition to these behavioral differences, several neuroendocrine studies have found increased hormonal and physiological reactivity in RLA-I rats compared to RHA-I rats, both at rest and in response to threatening situations (Carrasco et al., 2008; Díaz-Morán et al., 2012; Steimer & Driscoll, 2005; Thierry & Peter, 2003). Specifically, both outbred and inbred RLA rats exhibit increased stress responses (e.g., higher levels of

ACTH, corticosterone, and prolactin) and adopt a more passive coping style when facing new environmental situations. By contrast, RHA rats show lower rates of anxiety in novel situations and a greater tendency to sensation seeking, drug self-administration, and impulsivity (Carrasco et al., 2008; Díaz-Morán et al., 2012; Giorgi, Piras, & Corda, 2007; Steimer & Driscoll, 2005; Thierry & Peter, 2003). Within this context, recent studies have shown higher rates of impulsivity and lack of inhibition in RHA-I rats as opposed to RLA-I rats when exposed to impulsivity tasks, such as the schedule-induced polydipsia, delay-discounting task and five-choice serial reaction time (Moreno et al., 2010). Similarly, RHA-I rats exhibit higher rates of ethanol voluntary consumption in comparison to their RLA-I counterparts (Manzo et al., 2012).

Moreover, strain neuroanatomical and functional differences have been observed in brain structures associated with emotion and motivation, such as the amygdala, the hippocampus, the nucleus accumbens, and the prefrontal cortex (Driscoll, Fernández-Teruel, Corda, Giorgi, & Steimer, 2009; Gómez, Morón et al., 2009). These divergences are accompanied by neurochemical and molecular differences that affect neurotransmitter systems such as dopamine, serotonin, GABA, glutamate, acetylcholine, and neuropeptides (D'Angio, Serrano, Driscoll, & Scatton, 1988; Giorgi, Piras, Lecca, & Corda, 2005; Giorgi et al., 2005; Guitart-Masip et al., 2006; Guitart-Masip et al., 2008; Lecca, Piras, Driscoll, Giorgi, & Corda, 2004). In this regard, several lines of evidence support the view that the behavioral patterns that distinguish the Roman lines may be mediated, at least in part, by differences in the functional properties of their mesotelencephalic dopaminergic projections. For example: (1) *in vivo* voltammetry and microdialysis studies have shown that a variety of stressors and anxiogenic

drugs activate the mesocortical dopaminergic pathway of RHA, but not of RLA rats (D'Angio et al., 1988; Giorgi, Lecca, Piras, Driscoll, & Corda, 2003), (2) RHA rats have a faster turnover rate of dopamine in the caudate nucleus (Driscoll, Dedek, D'Angio, Claustre, & Scatton, 1990), and display more intense stereotypes in response to an acute challenge with the dopamine receptor agonist apomorphine (Driscoll, Dedek, Fuchs, & Gentsch, 1985; Giménez-Llort et al., 2005) than do RLA rats, and (3) binding studies indicate that the density of dopamine D₁ receptors in the nucleus accumbens is higher in RHA rats than in their RLA counterparts (Giorgi et al., 1994).

Finally, the development of new genetic techniques allows for the studying of the genetic basis of anxiety-related responses in Roman rats. For example, Fernández-Teruel et al. (Fernández-Teruel, Escorihuela et al., 2002) identified a locus in chromosome 5 associated with increased freezing behavior in the fear conditioning paradigm, and decreased avoidance and inter-trial responses in the two-way active avoidance paradigm. Taken together, these neurobiological findings could explain the divergent behavioral traits that characterize these strains of animals (see Driscoll et al., 2009, for review).

Our research group has recently extended the behavioral phenotyping of Roman rats to responses induced by incentive loss, supporting theories that account for these responses on the basis of emotional mechanisms (Amsel, 1992; Flaherty, 1996; Papini, 2006). SNC effects were observed in RLA-I rats as opposed to RHA-I rats in both instrumental (iSNC) and consummatory (cSNC) tasks. For example, an impairment of the instrumental response (running) was observed in RLA-I (but not in RHA-I) rats, when animals were downshifted from 12 pellets to

2 pellets, presented in the goal box of a straight alley (Rosas et al., 2007). Similar results were obtained by decreasing the time spent in the safe compartment (from 30 s to 1 s) of a one-way avoidance box (Torres et al., 2005). Strain differences were also found in a consummatory situation: cSNC. The RLA-I strain showed a slower recovery from the consummatory suppression induced by downshifting animals from 22% sucrose in the preshift phase to 4% sucrose in the postshift phase (Gómez, Escarabajal et al., 2009).

RHA-I/RLA-I behavioral differences were also observed in an instrumental situation involving reward omission. In this situation, the RLA-I strain exhibited a faster extinction rate compared to the RHA-I strain (Gómez, de la Torre et al., 2009). Similar results were recently obtained by Coppens et al¹ (Coppens, de Boer, Steimer, & Koolhaas, 2013). However, these strain differences in extinction disappeared when animals were previously exposed to an acquisition phase in which the presentation and the omission of the reinforcer was randomized (partial reinforcement; Gómez et al., 2008).

Overall, the results obtained by our research group in frustration paradigms have extended to reward loss situations the behavioral phenotyping of Roman rats (see Annex I: Cuenya et al. 2011). The next step was to explore the genetic basis of frustration by analyzing whether differential gene-expression profiles in the brain underlie the behavioral differences among Roman strains described above. To this aim, I first

¹ These authors used an operant task in which the schedule of reinforcement was changed from a fixed-ratio 1 schedule to a variable interval 15 schedule, followed by an extinction phase.

² The social stress paradigm consisted of four encounters with an aggressive Long-Evans male rat. Each Long-Evans male rat was vasectomized and housed with a

extended the behavioral characterization of Roman rats with respect to frustration responses, and then used both microarray and real-time reverse transcription chain reaction (qRT-PCR) complementary techniques to identify strain differences in brain gene expression that would correlate with frustration responses. This approach will be useful to explore the

C. GOALS AND HYPOTHESES

The main goal of this dissertation was to extend the behavioral characterization of the inbred Roman rats (RHA-I and RLA-I) with respect to situations of reward devaluation and reward omission, as well as to identify strain differences in gene expression in the brain that could underlie the differences observed between Roman rats in these situations.

This general aim can be divided into the following specific goals:

- (1) To extend the experimental research to the study of the behavioral effects of frustration in Roman rats, using the consummatory and instrumental PRCEs effects as incentive loss paradigms.
- (2) To analyze the genetic basis underlying emotional reactivity differences among these strains. These studies were performed using microarray and qRT-PCR techniques in brain samples to analyze the differential gene expression profiles of these strains of rats. There were two experimental conditions: basal condition (without any behavioral experience) and frustration condition (iSNC). In the first case, whole-brain tissue was analyzed, whereas in the second case, the hippocampus was chosen because of its role in instrumental tasks involving reward loss (Flaherty, Coppotelli,

Hsu, & Otto, 1998; Franchina & Brown, 1971; Leszczuk & Flaherty, 2000).

I based these studies on the following hypotheses and predictions. PRCE is defined as a reduced contrast effect observed after training with partial reinforcement compared to continuous reinforcement (Pellegrini, Muzio, Mustaca, & Papini, 2004). Given that consistent differences have been observed between RHA-I and RLA-I rats in both acute (contrast, appetitive extinction) and chronic (partial reinforcement) frustration tasks (Gómez et al., 2008; Gómez, Escarabajal et al., 2009; Gómez, de la Torre et al., 2009; Rosas et al., 2007; Torres et al., 2005), it was hypothesized that the more anxious RLA-I rats would show more robust behavioral effects induced by frustration (SNC and PRCE) than the less anxious RHA-I rats, in both consummatory and instrumental tasks. Second, we expected to find differences in the expression of genes functionally linked to negative emotions (e.g., Harada, Yamaji, & Matsuoka, 2008; Hou et al., 2009; Mei et al., 2005; Wang et al., 2003), and in genes previously shown to be differentially expressed in Roman rats (Blázquez-Romero et al., 2012; Fernández-Teruel, Escorihuela et al., 2002; Sabariego et al., 2011; Zhang, Amstein, Shen, Brush, & Gershenfeld, 2005). Third, I expected new genes to be differentially expressed in these strains. The nomination of unsuspected genes as candidate genes underlying frustration-mediated processes can be facilitated by the use of this assumption-free approach of gene expression profiling.

D. SUMMARY OF EXPERIMENTAL STUDIES

This section presents a brief summary of the experimental work that will be developed in detail in the attached papers. I begin with a general summary of the behavioral and genetic methods, followed by an analysis and discussion of the results. This summary ends with a general discussion of the psychogenetic differences in frustration from a behavioral and a genetic point of view.

GENERAL METHOD

SUBJECTS

Inbred Roman High- (RHA-I) and Low-Avoidance (RLA-I) rats bred at the Autonomous University of Barcelona were used in these experiments.

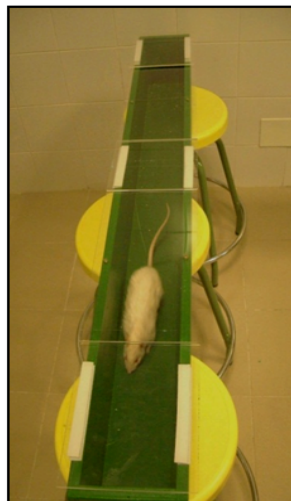
The animals were approximately 90 days old at the beginning of the experiments, were housed in pairs in plastic cages, and deprived to 80-90% of their *ad libitum* weight. Subjects used for the basal genetic analysis had water and food *ad libitum*. For the studies involving appetitive reinforcers, animals had free access to water. The level of deprivation in each case was maintained through the duration of the experiment. Room temperature was kept at about 20°C. Animals were maintained under a 12-h light/12-h dark cycle with lights on at 08:00 h. All testing sessions were performed between 09:00 h and 14:00 h. All the experiments were conducted following European Union guidelines for the use of animals in research (86/609/EEC).

APPARATUS, BEHAVIORAL AND GENETIC PROCEDURES

Instrumental tasks

The test apparatus used for conducting the instrumental experiments were two identical straight runways measuring 120 cm×11 cm×14 cm (LxHxW) and divided into three sections separated by cardboard guillotine doors. The start section measured 20 cm, the running section measured 80 cm; and the goal section measured 20 cm. The walls and floor of the runways were made of painted wood (green). The entire length of the runway was covered by clear Plexiglas lids. Food pellets (45 mg, formula P; Research Diets, Noyes Precision Pellets, Lancaster, NH) were used as the reward. Pellets were placed on the floor at the distal end of the goal box. Time to run through the runway was manually registered by using a chronometer (Exttech, model 365510, Madrid, Spain). Trials began as soon as the start door was raised and the chronometer was stopped when the rat entered the goal section with its four paws.

Figure 1: Straight Alley



In the PRCE experiment, rats were moved from the colony to an adjacent experimental room in squads of 18 and in their own home cages. The floor of the apparatus was vacuumed and wiped with a 5% ethanol solution after every squad finished its session. The experiment was conducted in three phases: pretraining, preshift, and postshift. Three habituation days to the apparatus preceded training. On the first day, rats were placed in the start box with both doors open and given five 1-min access periods to the entire runway spaced about 20 min apart. On the following day, rats were given two 2-min access periods, followed by two goal-box feedings (the animal was confined to the goal box and given the appropriate number of pellets, either 12 or 2) and an additional trial in which the pellets were spread throughout the runway. For the continuous and partial reinforcement groups (HC12-2, HP12-2, LC12-2 and LP12-2), the preshift reward was 12 pellets, and for the controls groups (H2-2 and L2-2) the reward was 2 pellets (H and L refers to RHA-I and RLA-I strains, respectively). Each group had 6 animals. The last habituation day consisted of three goal-box feedings spaced about 20 min apart. Subjects were given a maximum of 30 s to consume the food reward and were then removed from the goal box. Twelve pellets were placed in the home cage 30 min after the third habituation session along with their daily ration of lab chow.

Training began on the fourth day. Each animal was placed in the start box with the start box door closed and the goal box door opened. The start box door was then opened and the rat was allowed to run down the runway to obtain the food reward. Groups HC12-2 and LC12-2 received 12 pellets per trial, whereas Groups HP12-2 and LP12-2 had an unpredictable alternation between reinforced (12 pellets) and non-reinforced trials. The sequence of reinforced and non-reinforced trials was randomly arranged

by using Gellermann's sequences (Gellermann, 1933) with a similar number of reinforced to non-reinforced transitions and vice versa. Controls groups (H2-2 and L2-2) received 2 pellets per trial. A maximum time of 20 s was allowed for the rat to complete the trial. If the rat did not reach the goal box before 20 s had elapsed, it was gently pushed down the runway and 20 s were assigned as the latency for that trial. When the rat reached the goal box, the goal box door was closed and a second stopwatch was started. The rat was given a maximum of 30 s to consume the food reward. As soon as the rat had finished eating or 30 s had elapsed, it was removed from the goal box and placed back in its home cage. The rats were kept in the home cage between trials. Each rat received 6 trials per session every day; the preshift phase lasted 5 days.

On the first trial of the postshift phase, the rats receiving 12 pellets (continuous or partial) were shifted to 2 pellets. The rats receiving 2 pellets remained at that level. The postshift phase lasted 6 days and each daily session had 6 trials.

A similar procedure was used for conducting the iSNC hippocampal microarray study. Rats were moved from the colony to an adjacent experimental room in their own home cages and then carried to the experimental room in squads of 8. The experiment was also conducted in three similar phases: pretraining, preshift, and postshift. For half of the animals in each strain, RHA (n=16) and RLA (n=16), the preshift reward was 12 pellets per trial (Groups H12-2 and L12-2). For the other half of rats in each strain, RHA (n=16) and RLA (n=16), the reward was set at 2 pellets per trial in all sessions (Groups H2-2 and L2-2). The preshift phase lasted 10 days, whereas the postshift phase lasted between 1 and 3 days

depending on the latency criterion (see Annex IV: Sabariego et al., submitted to Behavioural Brain Research).

Consummatory task

The consummatory PRCE was conducted in experimental chambers made of Plexiglas, 30 cm long, 30 cm high, and 15 cm wide. A tray filled with sawdust bedding was placed on the floor to collect faeces and urine. Spouts attached to graduated burettes containing the sucrose solution were placed into the chamber through a 1.6-cm hole located in the front panel of the cage, 10.7 cm above the floor.

Figure 2: Consummatory boxes



Rats were moved from the colony to an adjacent experimental room in their own home cages, 6 at a time. Each rat was assigned to one of 6 boxes and always trained in that box. The order in which squads were trained varied across days. Once a set of rats finished its session, experimental chambers were wiped with a damp paper towel, faeces removed, and bedding sawdust replaced as needed. Training consisted of a total of 20 daily sessions conducted in two phases, preshift (16 sessions)

and postshift (4 sessions). One habituation day in the experimental chamber preceded the preshift phase. On this first day, rats were placed on the training box and given a 5-min period without access to sucrose solution. Preshift phase began on the second day. Each animal was placed in the experimental box with spouts attached to graduated burettes. A maximum time of 5-min was allowed for the rat to complete the session from its first contact with the spout. The amount of sucrose solution consumed was recorded. As soon as the rat had finished the 5-min session, it was removed from the experimental box and placed back in its home cage.

After 16 sessions in which animals received a sucrose solution of 22% (continuous vs. partial) or 4%, depending on the experimental condition, all groups received a 4% sucrose solution during 4 consecutive sessions (postshift phase). There were 6 Groups in this experiment ($n = 6$). For groups HC22-4, LC22-4, HP22-4, and LP22-4, the 16 preshift sessions involved access to a 22% sucrose solution (prepared v/v by mixing 22 g of commercial sugar for every 78 g of distilled water), whereas during the postshift phase they were exposed to the 4% sucrose solution (prepared v/v by mixing 4 g of commercial sugar for every 96 g of distilled water). Groups HC22-4 and LC22-4 received the reward on every trial, whereas Groups HP22-4 and LP22-4 had an unpredictable alternation (R-N-R-R-N N-R-N-R-N-N-R-N-R, Pellegrini et al., 2004) between reinforced (22% sucrose) and non-reinforced trials (distilled water). The control Groups H4-4 and L4-4 received access to the 4% solution for the entire experiment. Sucrose solutions were mixed daily.

Microarray and and qRT-PCR

A microarray is a small analytical device that allows genomic analysis with speed and precision (Lee and Saeed 2007). The design and capacity of microarrays allows the analysis of the entire genome in a single experiment. The expression of tens of thousands of genes can be simultaneously explored, thus allowing a complete genome-wide analysis of the alteration of the gene expression taking place between two different biological conditions. This technology is widely used in biomedical research to detect altered gene expression of particular genes in a given disease when compared to healthy controls. The obtained results are generally validated, using the qRT-PCR technique amplifying those genes found to be differentially up-regulated or down-regulated among situations. Both procedures were carried out by IVIOMICS (Valencia, Spain).

Two genetic experiments were conducted. In the first, whole-brain samples of Roman rats maintained *ad libitum* under resting conditions were used. In the second, hippocampal samples were extracted after a downshift experience (iSNC) and compared to unshifted control groups.

Microarray analysis and qRT-PCR procedures

RNA preparation

Rats were decapitated (2.5 h after the end of the behavioral task in the second experiment) and the whole brains or the hippocampi, respectively, were immersed in liquid nitrogen and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ since the day of sacrifice and dissection. Total RNA was extracted using the

'TRIZol method' according to the protocol recommended by the manufacturer (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD). In short, homogenized biopsies (1 ml TRIZol reagent/75mg tissue) were incubated at room temperature for 5 min, chloroform (0.2 volumes of TRIZol) was then added and samples incubated for 2.5 min at room temperature. Thereafter, the samples were centrifuged for 15 min at 12000 g (4 °C). The aqueous phase was precipitated with an equal volume of 2-propanol, stored in ice for 5 min and centrifuged for 30 min at 12000 g (4 °C). The pellet was washed with 75% ethanol and dissolved in DEPC-treated water. The integrity of the RNA samples (RNA quality control procedure) was assessed by using the 2100 bioanalyzer (Agilent technologies, Madrid, Spain), running an aliquot of the RNA samples on the RNA 6000 Nano LabChip (Agilent technologies, Madrid, Spain) (The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements; Schroeder et al., 2006).

cDNA microarray

All samples were hybridized onto the Whole Rat Genome Oligo Microarray (Agilent technologies, Madrid, Spain) encompassing more than 55,000 rat DNA probes. The protocols for sample preparation and hybridization of the samples were adapted from the Agilent Technical Manual. In short, first strand cDNA was transcribed from 1 mg of total RNA using T7-Oligo (dT) Promotor Primer. Samples were in vitro transcribed and Cy-3 labelled (all with the Quick-AMP labelling kit (Agilent technologies, Madrid, Spain). The cRNA synthesis typically yielded between 10 and 15 µg. Following a further clean-up round (QIAGEN, Barcelona, Spain), cRNA was fragmented into pieces ranging from 35 to 200 bases which were confirmed using Agilent 2100 Bioanalyzer technology.

Fragmented cRNA samples (1.65 µg) were hybridized onto chips through 17 h of incubation at 65°C with constant rotation, then microarrays were washed in two steps of 1 min in two Washing buffers (Agilent technologies, Madrid, Spain). Hybridized microarrays were scanned in a Axon 4100A scanner (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and data extracted with GenePix Pro 6.0 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Reverse transcription-polymerase chain reaction

Total RNA (0.5 µg) was reverse-transcribed using an Advantage RT-for-PCR kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Each sample was diluted to a final volume of 12.5 ml in diethylpyrocarbonate (DEPC) treated water, and 1 µl oligo (18-dT) was added, heated at 70 °C for 2 min, and kept on ice until 6.5 µl mastermix–4 µl 5X reaction buffer, 1 µl dNTP mix of 10 mmol each, 0.5 µl recombinant RNase Inhibitor, 1 µl MMLV (Moloney-Murine Leukaemia Virus) reverse transcriptase was added. The reaction was incubated at 42 °C for 1 h, and heated at 94 °C for 5 min to stop cDNA synthesis and destroy DNase activity. The products were diluted to a final volume of 50 µl in DEPC-treated water. . Real-time PCR was performed using a LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions on a Roche LightCycler platform (Roche, Göttingen, Germany). We employed 200 ng of cDNA for each analyzed sample. A calibration curve was included in each experiment (five serial dilutions).The final products were analyzed by using the provided software (Roche Molecular Biochemicals LightCycler Software v3.5). Data are presented as the ratio between the expression of the gene vs. that of the human GAPDH gene. Melting curves were analyzed to confirm amplification specificity. Melting curves were analyzed to confirm amplification specificity.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using the R software (<http://www.r-project.org/>) and the appropriate Bioconductor packages (<http://www.bioconductor.org/>) run under R. In order to remove all the possible sources of variation of a non-biological origin between arrays, densitometry values between arrays were normalized using the quantiles normalization function implemented in the Bioconductor *limma* package. In the microarray study that analyzed Roman brain samples in basal conditions, statistically significant differences between groups were identified using the *multtest* function implemented in the Bioconductor *multtest* package (FDR < 0.05). Those genes showing both an absolute fold change (RLA/RHA) value > 1.5, and FDR < 0.05 were considered as significant. In the second study, statistically significant differences between groups were identified using the rank product nonparametric test implemented in the Bioconductor *RankProd* package. Functional annotations were carried out using the Ingenuity Pathways Analysis platform (<http://www.ingenuity.com/>; 07/22/11).

ANALYSIS AND DISCUSSION OF THE PRCE (ANNEX II)

The first goal of this dissertation was to extend the behavioral characterization of the inbred Roman rats (RHA-I and RLA-I) to situations involving reward omissions and devaluations (frustration). To this end, I studied strain differences in the PRCE in both consummatory and instrumental tasks.

The instrumental PRCE (iPRCE) evaluates whether the contrast effect can be attenuated by a chronic experience of frustration induced by

partial reinforcement. The results indicated that the contrast effect was only observed in the more anxious RLA-I strain. A similar result was obtained with RLA-I females in a previous study (Rosas et al., 2007); thus, the present results extend the SNC to males of the RLA-I strain. Most importantly, the present study provides the first evidence showing that incentive contrast is not observed in RLA-I animals previously exposed to a chronic experience of frustration induced by partial reinforcement. Thus, in frustration-prone RLA-I rats, previous frustrating experience (partial reinforcement during the preshift phase) can counteract the effects of a new frustrating experience (incentive downshift during the postshift phase). This demonstration of the iPRCE in RLA-I rats completes the picture of this strain as a valid animal model of frustration. RLA-I rats (but not RHA-I rats) show a remarkable sensitivity to a wide variety of frustration-related procedures, such as appetitive extinction, iSNC, cSNC, and PREE (Gómez et al., 2008; Gómez, de la Torre et al., 2009; Rosas et al., 2007). By contrast, just as it happened in previous, related experiments, the iPRCE did not appear in the RHA-I strain, as running latencies in RHA-I rats during the postshift phase were similar regardless of the reinforcement schedule (partial vs. continuous) or the amount of reward (12 vs. 2 pellets) received in the preshift phase.

In addition, the RHA/RLA performance differences observed during the preshift phase of the present study agree with performance divergence previously obtained in our laboratory using female rats and a similar instrumental runway task, in which SNC, appetitive extinction, and PREE were induced (Gómez et al., 2008; Gómez, de la Torre et al., 2009; Rosas et al., 2007). These strain differences consistently appeared regardless of the magnitude of the reinforcer (12 pellets, 2 pellets, or 1 pellet) and the

reinforcement schedule (continuous vs. partial). These divergences could be dependent on RHA-I/RLA-I differences observed in the mesolimbic dopaminergic transmission pathway that seem to modulate responses to the reinforcing properties of natural and artificial rewards (see Giorgi, Piras, & Corda, 2007, for review).

Coming back to the results obtained during the postshift phase, it was observed that the unexpected reduction in the amount of reward (from 12 to 2 pellets) significantly impaired the running response and induced an iSNC effect only in the more anxious RLA-I rats exposed to continuous reinforcement in the preshift phase, as opposed to RLA-I rats exposed to partial reinforcement and the less anxious RHA-I animals receiving partial or continuous reinforcement before the reward downshift. Several lines of evidence have demonstrated that the surprising reduction or omission in the magnitude of an expected reward triggers an aversive emotional response of frustration or disappointment similar to a fear/anxiety state (Gray & McNaughton, 2000). The results obtained in the present study provide additional support for this hypothesis, since the more anxious RLA-I rats showed an iSNC effect that was not observed in the less anxious/fearful RHA-I animals.

The absence of iSNC effect observed in RLA-I rats exposed to partial reinforcement in the preshift phase, as well as the absence of performance differences between RHA-I and RLA-I rats trained under partial reinforcement can also be discussed within this context. Behavioral persistence observed after an experience of partial reinforcement (such as the PREE or the iPRCE induced in the present study) refers to the fact that any type of reward inconsistency tends to induce behavioral persistence (Cuenya, Fosachecha, Mustaca, & Kamenetzky, 2011; Kamenetzky, Mustaca,

& Papini, 2008; Papini, 2003; Rosas et al., 2007). Although several theories have been proposed to account for this effect, most of them have considered that partial reinforcement phenomena are closely dependent upon emotional mechanisms (Amsel, 1994), given that (1) previous experience with partial reinforcement can increase subsequent behavioral resistance to other frustrating nonreward situations, such as the cSNC, but this effect is attenuated by the administration of the anxiolytic drugs chlordiazepoxide (Pellegrini et al., 2004) and ethanol (Kamenetzky et al., 2008); (2) lesions of the septohippocampal system abolish the PREE (Feldon, Rawlins, & Gray, 1985; Henke, 1973); (3) chronic administration of anxiolytic GABAergic compounds in both acquisition and extinction phases tends to decrease persistence in partially reinforced subjects, abolishing the PREE in spaced-trial procedures (see Gray, 1987; Leslie, Shaw, McCabe, Reynolds, & Dawson, 2004, for review); and (4) differences in resistance to extinction after partial reinforcement were obtained in female RLA-I and RHA-I rats, the former showing a PREE that was not observed in the latter. The results obtained in the present study could be considered as an additional support for emotional theories of the PRCE (see Annex II: Cuenya et al. 2012).

Behavioral differences exhibited by RHA-I and RLA-I strains are clearly observed when animals have to perform an instrumental response to obtain the reinforcer (Gómez, de la Torre et al., 2009; Rosas et al., 2007). However, inconsistent results have been obtained when the required response directly involves the consumption of the reward (Gómez, Escarabajal et al., 2009; unpublished results from our laboratory). For example, Gómez, Escarabajal et al. (2009) found in both RHA-I and RLA-I rats a significant suppression of drinking (cSNC) when they were

downshifted from 32% to 4% sucrose, in comparison to RHA-I and RLA-I control groups always exposed to 4% sucrose (see Experiment 1). By contrast, when the preshift–postshift reward discrepancy was reduced from 32-4 to 22-4 in Experiment 2, both strains showed a suppression of fluid intake on the first postshift trial, but only the more emotional RLA-I strain maintained this suppression on subsequent trials. These results suggest that differences between the Roman rat strains in consummatory contrast paradigms can best be observed when the reward disparity is not very large (Gómez, Escarabajal et al., 2009).

In view of the above, we carried out an experiment of consummatory PRCE (cPRCE) in which the sucrose disparity was attenuated (22%-4%), relative to the standard protocol (32%-4%). The main objective of this experiment was to test whether the strain differences found in the iPRCE could also be observed in a consummatory task. As opposed to the results obtained in the iPRCE experiment, no strain differences were found when a consummatory task was used to induce frustration and behavioral persistence in Roman rats. In this case, both RLA-I and RHA-I animals exhibited a cSNC effect when downshifted from 22% to 4% sucrose, this effect being attenuated in partially reinforced groups (cPRCE).

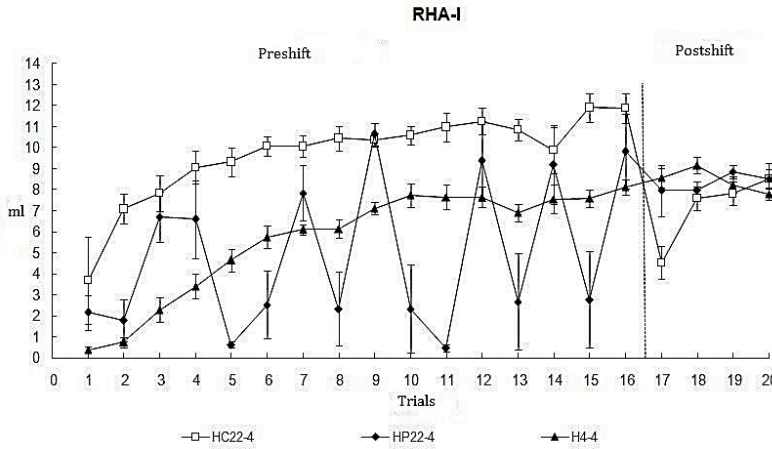


Figure 3: Mean values of sucrose consumption in preshift and postshift phases in RHA-I rats. Bars denote standard errors of the mean.

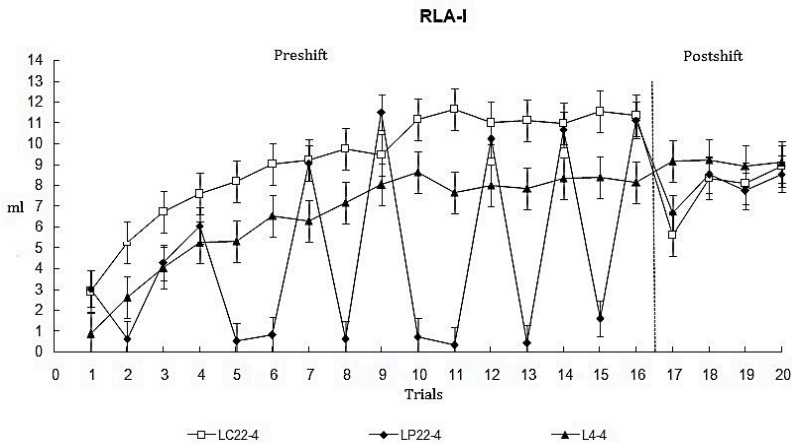


Figure 4: Mean values of sucrose consumption in preshift and postshift phases in RLA-I rats. Bars denote standard errors of the mean.

This result suggests that the consummatory procedure is less sensitive to detecting differences in emotional responses between RHA-I and RLA-I strains, a conclusion consistent with previous studies conducted by our research group (Gómez, Escarbal et al., 2009; unpublished results). As discussed in preceding pages, RHA-I rats tend to show active coping

strategies in novel and threatening situations, whereas RLA-I rats have a marked tendency to show more passive coping behaviors, like freezing or grooming (Driscoll et al., 2009; Steimer & Driscoll, 2005; Thierry & Peter, 2003). These differences may offer an explanation for the relative insensitivity of consummatory tasks to detect strain differences. These opposite behavioral traits would be hardly detected by a consummatory task in which the animal does not need to show an active response. However, the instrumental task requires a behavioral response by the animal (e.g., running to the goal box), a fact that may induce strain differences more easily. Although some researchers have recently shown that the consummatory suppression is a direct consequence of incentive downshift, and not a byproduct of the increase in competing behaviors (Lopez-Seal, Cuenya, Suarez, & Mustaca, in press), these results should be taken with caution, since the strains used in this study were Wistar rats, and it is known that Roman rats exhibit more extreme differences in coping strategies. Therefore, our results will be evaluated in future experiments by including not only consummatory measures, but also other specific behavioral patterns that could be divergent between Roman rats (e.g. rearing, ambulation, exploration, grooming). These behaviors could differentially interfere with the consummatory response in RHA-I vs. RLA-I rats, preventing us from observing differences between the strains by solely registering the consummatory response.

***ANALYSIS AND DISCUSSION OF DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION
BETWEEN RHA-I AND RLA-I RATS IN BASAL CONDITIONS (ANNEX III)***

Molecular and cellular experiments devoted to the exploration of the genetic basis of behavior have been traditionally limited to the study of individual or small groups of genes (Wang et al., 2003). Microarray

techniques allows for the simultaneous assessment of thousands of genes to identify gene-expression profiles that could be related to complex traits. This promising approach is being successfully applied to the study of brain-behavior relationships.

The second goal of this dissertation was to study the genetic basis of frustration. This study was designed to compare large-scale gene expression profiles in the Roman rat strains. After appropriated brain tissue preparation, data normalization, and statistical analyses, I identified a considerable number of genes that are differentially expressed between the two Roman strains (14 upregulated and 24 downregulated genes in RLA-I rats compared to their RHA-I counterparts), some of them being related to neurological diseases, nervous system development and function, and behavior. Among the list of the differentially expressed genes (shown in Table included in Annex III: Sabariego et al. 2011), five genes selected for qRT-PCR validation have been repeatedly linked to behavioral traits shown to be differentially expressed in RHA-I vs. RLA-I rats (e.g., fearfulness, stress reactivity, novelty seeking, impulsivity, and vulnerability to drug abuse): *EPHX2*, *PRL*, *CAMKK2*, *CRHBP* and *HOMER3* (Eede, Broeckhoven, & Claes, 2005; Luria et al., 2009; Onaka, Takayanagi, & Leng, 2010; Szumlinski, Ary, & Lominac, 2008; Wayman, Lee, Tokumitsu, Silva, & Soderling, 2008).

The *EPHX2* gene was up-regulated in RLA-I in comparison to RHA-I rats. This gene (located in chromosome 8p21.2) encodes a member of the epoxide hydrolase protein family, a bifunctional enzyme that binds to specific epoxides and converts them to the corresponding dihydrodiols (Spector, 2009). The activity of this enzyme may be involved in biological functions such as cholesterol metabolism, regulation of vascular tone, renal

tubular transport, cardiac contractility, angiogenesis, fever modulation, inflammation, and antinociception (Conroy et al., 2010). In the mouse brain, expression of epoxide hydrolase was widely found in cortical and hippocampal astrocytes, and also in a few specific neuron types in the central amygdala, cortex, cerebellum, striatum, and medulla, where its functional significance is still unknown (Bianco, Agassandian, Cassell, Spector, & Sigmund, 2009; Marowsky, Burgener, Falck, Fritschy, & Arand, 2009). Luria et al. (2009) recently characterized a knockout mouse colony lacking expression of the EPHX2 gene. This genotype was associated with decreased plasma testosterone levels, sperm count, and testicular size in male mice, and also with a significant decline in plasma cholesterol levels. Compared to wild type animals, null mice showed lower levels of exploratory behavior in the open-field test and reduced hedonic response when warmed sweetened condensed milk was presented for seven consecutive days. These results suggest a role of the EPHX2 gene in the regulation of responses (related to anxiety and hedonism) that have been repeatedly observed as divergent in Roman rats (Driscoll et al., 2009).

PRL gene was significantly upregulated in RLA-I rats with respect to RHA-I rats. Interestingly, several lines of evidence implicate prolactin brain pathways in anxiety and stress responses. Thus, it has been repeatedly reported that a variety of anxiogenic stimuli, including conditioned fear, acute or chronic restraint stress, nociceptive stimuli, and exercise activate prolactin-releasing peptide neurons that regulate prolactin levels in several brain areas (see Onaka et al., 2010, for review). However, this possible role of prolactin in anxiety and stress seems to vary with the particular type of physical or psychological stress (Ratner, Yelvington, & Rosenthal, 1989; Yelvington, Weiss, & Ratner, 1984; Yelvington, Weiss, & Ratner, 1985) and

suggests that the amount of control an organism exerts over the stressor is a salient determinant of the extent to which prolactin will be released in aversive situations (Telner, Merali, & Singhal, 1982).

Of particular interest in this context is the finding that both the outbred and the inbred Roman strains exhibit very large differences in their prolactin response to novelty-related emotional stimulation, the RLA line showing an exacerbated prolactin response not observed in the RHA line (Castanon, Dulluc, Le Moal, & Mormède, 1992; Gentsch, Lichtsteiner, Driscoll, & Feer, 1982; Steimer, la Fleur, & Schulz, 1997; Steimer & Driscoll, 2005). This between-strain neuroendocrine difference was abolished by neonatal handling, an early experience known to decrease the emotional reactivity/fearfulness in RLA animals (Steimer, Escorihuela, Fernandez-Teruel, & Driscoll, 1998). The finding that prolactin gene mRNA expression is upregulated in RLA-I in comparison to RHA-I seems to be in agreement with these results and suggests that prolactin function could probably be one of the most discriminating neuroendocrine traits in the Roman lines (Castanon, Perez-Diaz, & Mormède, 1995).

CaMKII gene was up-regulated in RLA-I rats in comparison to RHA-I rats. CaM kinases (CaMKs) constitute a family of protein kinases whose activities are initially modulated by binding Ca^{2+} /calmodulin and subsequently by protein phosphorylation. One member of this family, CaMKII, is well-established for its effects in modulating neuronal development and synaptic plasticity, such as long term potentiation and depression (see Wayman et al., 2008, for review), and it has been proposed as a candidate in the search for “memory molecules” (Griffith, 2004). Aversive learning is one of the most extensively used behavioral paradigms for investigating the role of CaMKII on learning, memory, and stress-related

disorders (e.g., Atkins, Selcher, Petraitis, Trzaskos, & Sweatt, 1998; Murai et al., 2007; Murai et al., 2007; Rodrigues, Farb, Bauer, LeDoux, & Schafe, 2004). For example, Mei et al. (2005) applied the gene-chip technique for the analysis of the large-scale transcriptional responses that occur in the amygdala and hippocampus after fear conditioning. They found that CaMKII gene expression was downregulated in the hippocampus 6 hours after fear conditioning, a result that was validated by qRT-PCR (Mei et al., 2005). Similarly, Kabbaj et al. (Kabbaj, Evans, Watson, & Akil, 2004) conducted a study with outbred rats selected on the basis of their high (HR) vs. low (LR) rates of exploratory locomotion. These animals were exposed to a social mild stress² and hippocampus were genetically analysed 2'5 hours later. Microarrays, qRT-PCR and in-situ hybridization showed that social defeat significantly increased mRNA expression of CaMKII in LR rats, but not in HR rats, in the CA1 and CA3 areas of the hippocampus. These findings suggest that learning and memory functions may be differentially modulated by social stress in HR vs. LR rats. However, more studies are needed to examine this hypothesis (Kabbaj et al., 2000; Kabbaj et al., 2004). In general, these results (Kabbaj et al., 2004; Mei et al., 2005) suggest the implication of the CaMKII molecule in learning and memory functions associated to emotionally negative experiences. Interestingly, it has been reported that RHA-I and RLA-I rats exhibit a different pattern of responses when they are exposed to unconditioned and conditioned fear stimuli (Aguilar et al., 2003; López-Aumatell et al., 2009). Therefore, future behavioral experiments will determine whether CaMKII gene is a leading

² The social stress paradigm consisted of four encounters with an aggressive Long-Evans male rat. Each Long-Evans male rat was vasectomized and housed with a normal cycling female rat to enhance territorial behavior and aggressiveness. Prior to each agonistic interaction, the resident's mate was transferred to another cage.

candidate in the search for the genetic basis of the strains' behavioral differences observed in anxiogenic/stressful situations.

The CRHBP gene was down-regulated in the RLA-I strain as compared to the RHA-I strain. This gene encodes a protein that belongs to the corticotropin-releasing hormone-binding protein family: the corticotropin-releasing factor-binding protein. This protein seems to be related to anxiety, stress, and major depression mood disorder, as several studies suggest (Anisman, Merali, & Stead, 2008; Claes et al., 2003; Eede et al., 2005; Van der Heyden & Bradford, 1988). In rodents, high levels of CRHBP expression have been detected in the pituitary gland and in brain areas such as the cerebral cortex, dentate gyrus, CA1, and CA3 regions of the hippocampus, amygdaloid complex, bed nucleus of the stria terminalis, olfactory bulb, and sensory relays associated with the auditory, olfactory, vestibular, and trigeminal systems (Seasholtz et al., 2001). In most of these regions, CRHBP co-localizes with the corticotropin-releasing hormone (CRH) protein, suggesting that CRHBP could modulate the endocrine and synaptic activity of CRH, a hormone that has been widely recognized as one of the major hypophysiotropic hormones involved in the regulation of the mammalian behavioral, endocrine, and immune responses to stress (Eede et al., 2005). In agreement with this view, it has been shown that Sprague-Dawley rats showed a 2–3 fold increase in pituitary CRHBP mRNA levels 30–120 min after the initiation of a restraint stress experience, whereas adrenalectomy prevented this increase. Similarly, Lombardo et al. (Lombardo et al., 2001) found an increase in CRHBP expression in the basolateral amygdala after acute, but not chronic, restraint stress. Moreover, Herringa et al. (Herringa, Nanda, Hsu, Roseboom, & Kalin, 2004) examined the time course of the effects of acute restraint stress on central

and basolateral amygdala mRNA CRHBP expression, observing that these levels increased shortly after stress and remained elevated up to 21 h after the stressor. This effect was selective in the basolateral amygdala, as stress did not alter CRHBP mRNA levels in the central amygdala. Although animal models of altered CRHBP expression also support an important role of this protein in the regulation of behavioral and hormonal responses to stress, controversial results have been obtained in this respect. Thus, compared to appropriate wild-type controls, both pituitary CRHBP overexpressing male mice (α CRHBP and MT-CRHBP) and CRHBP-deficient male mice exhibited similar ACTH levels under basal conditions and also in response to a 30 min restraint stress (Burrows et al., 1998; Karolyi et al., 1999; Lovejoy et al., 1998). However, α CRHBP mice exhibited a significant increase in locomotion and rearing in the open field test and made more total arm entries in the elevated plus-maze (consistent with increased activity), and also showed a trend toward decreased anxiety, as indicated by the increased time spent in the open arms of the elevated plus-maze (Burrows et al., 1998). By contrast, CRHBP-deficient mice spent significantly less time and entered the open arms significantly fewer times than wild type mice, made fewer exits from the protected chamber in the dark/light emergence task, and spent less time in the central area of the open field. These data are consistent with increased anxiety-like behaviors in deficient CRHBP animals (Karolyi et al., 1999). Overall, these results suggest that increased CRHBP levels in response to stress may provide a feedback mechanism to maintain homeostasis of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (McClennen, Cortright, & Seasholtz, 1998), affecting the adaptation to stress exposure in some individuals and leading to stress related disorders, such as anxiety and depression (Eede et al., 2005). The fact that CRHBP mRNA expression is downregulated in the more stress-reactive RLA-I

strain (see Carrasco et al., 2008) as opposed to the RHA-I strain, could indicate a deficient function of CRHBP with respect to the negative modulation of the HPA axis, a hypothesis that deserves further investigation.

Finally, the HOMER3 gene was overexpressed in RHA-I rats with respect to RLA-I rats. HOMER3 encodes a member of the homer family of dendritic proteins. Some members of this family regulate group 1 metabotropic glutamate receptor function and may play an important role in maintaining the plasticity at glutamatergic synapses (Fagni, Ango, Perroy, & Bockaert, 2004). Interestingly, these proteins have been involved in brain plasticity phenomena related to drug seeking behavior and neuropsychiatric disorders (Szumlinski, Kalivas, & Worley, 2006; Szumlinski et al., 2008). Given that RHA-I and RLA-I rats probably differ in glutamate neurotransmission (Giorgi et al., 2005; Guitart-Masip et al., 2008), while they are clearly different regarding vulnerability to addiction (Corda et al., 2005), impulsivity (Moreno et al., 2010), novelty-seeking behaviour (Fernández-Teruel, Driscoll et al., 2002), and other phenotypes associated to the psychotic spectrum (Fernández-Teruel et al., 2006), the differential expression of this gene in the RHA-I and RLA-I strains deserves to be further examined in future behavioral and neurogenetic experiments.

Although the results obtained in this study suggest that the behavioral differences that characterize the RHA-I and RLA-I rats phenotypes are accompanied by basal differences in gene expression of key proteins for the modulation of fear, stress, anxiety, and novelty seeking (see Annex III: Sabariego et al. 2011), our data are preliminary and must be considered with caution for several reasons. First, our conclusions apply to females and may not be extrapolated to males until further investigation is

performed. Second, microarray technology was applied to whole-brain samples, so the present results do not identify the specific brain areas whose differential gene expression could underlie the divergent RHA-I/RLA-I phenotypes. Third, one has to keep in mind that although RHA-I and RLA-I rats have been genetically selected for variations in avoidance learning, they also differ in other traits as well. For instance, the RHA strain/line appears to show increased novelty seeking, locomotor activity, impulsivity, and vulnerability to drug abuse, and is also characterised by an active coping style (Driscoll et al., 2009; Giorgi et al., 2007; Moreno et al., 2010). Although the genetic co-segregation of different traits, particularly anxiety and passive/active coping style, is of great theoretical and clinical interest, this is a confounding factor to the study of their genetic bases. Therefore, the separate contribution of novelty-seeking and fearfulness traits with respect to gene expression divergence in the brains of Roman rats will have to be analyzed in future experiments in order to extend our understanding of the genetic basis of these behavioral traits.

***ANALYSIS AND DISCUSSION OF THE iSCN AND HIPPOCAMPAL GENE
EXPRESSION IN RHA-I AND RLA-I RATS (ANNEX IV)***

In this study, male Roman rats were exposed to an iSCN situation with several goals in mind. First, I explored whether strain differences in behavior could be obtained by unexpectedly reducing the reward magnitude from 12 pellets in the preshift phase to 2 pellets in the postshift phase, as previous studies suggest (Rosas et al., 2007). Second, we compared large-scale gene expression profiles in the hippocampus of RHA-I and RLA-I rats, to further investigate putative genetic mechanisms correlated with the strain differences observed in this frustrating task.

The iSNC effect only appeared in the more emotional RLA-I rats (higher response latencies in the Group L12-2 compared to Group L2-2 in the postshift phase), supporting theories that account for this effect on the basis of emotional mechanisms (Flaherty, 1996; Gray, 1987; Papini, 2006). Behavioral differences between strains and groups were accompanied by hippocampal divergence in the expression of 18 genes (see Table included in Annex IV: Sabariego et al., submitted). Four of them were validated through qRT-PCR, these genes being linked to behavioral/neurobiological traits shown to be divergent between Roman rats (TAAR2, THAP1, PKD2L1, and NANOS1).

Although the RGSL2H gene (encoding regulator of G-protein signaling 2) was not validated through qRT-PCR, it is worth noting that this gene has been proposed as a quantitative trait gene for anxiety behavior in mice (Yalcin et al., 2004), and it has also been associated with intermediate phenotypes and with human anxiety disorders (Koenen, Amstadter, & Nugent, 2009; Smoller et al., 2008). Any conclusion about the implication of this gene in the strain differences observed in iSNC will have to wait for confirmation and validation of the present results.

The trace amine receptor 2 gene (TAAR2), also known as GPR58 and corresponding to G-protein coupled receptor 58, was upregulated in 12-2 RLA rats compared to 12-2 RHA rats. The trace amines constitute a family of endogenous compounds with strong structural similarity to classical monoamine neurotransmitters (Borowsky et al., 2001; Bunzow et al., 2001), having been proposed as possible modulators of these neurotransmitters within defined physiological limits (Berry, 2007). Consistent to this view, trace-amine receptors are widely distributed in the monoaminergic systems of the brain and co-localized with the dopamine

transporter in a subset of dopaminergic neurons in the substantia nigra of rhesus monkeys and mice (Xie & Miller, 2009). Phenylethylamine (PEA) has been suggested as an endogenous ligand for trace-amine receptors (Bly, 2005b; Janssen, Leysen, Megens, & Awouters, 1999). PEA alters the monoamine transporter function in synaptosomes of the brain of mice and rhesus monkeys, suggesting a modulatory role for this receptor in the presynaptic regulation of monoaminergic activity (Xie & Miller, 2009).

Several lines of evidence indicate that aberrant levels of these amines are associated with various neuropsychiatric disorders, including schizophrenia, attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), drug abuse/dependence, depression, and stress/anxiety disorders (see Berry, 2007). Thus, PEA has been found to be elevated in the urine and blood of schizophrenics (O'reilly & Davis, 1994). Moreover, one polymorphism in TAAR2 gene has been suggested to be associated with schizophrenia (Bly, 2005a). Overall, these results are consistent with an over-activity of the trace-amine systems involved in the pathogenesis of schizophrenia (Berry, 2007).

PEA has been also identified as a possible factor for the onset of ADHD (Lindemann & Hoener, 2005). PEA has been shown to induce hyperactivity and aggression in experimental animals, two of the cardinal clinical features of ADHD (Sabelli, Mosnaim, & Vazquez, 1974). In addition, urinal PEA levels have been reported to be decreased in ADHD patients compared to both control subjects and patients with autism (Baker et al., 1991; Kusaga et al., 2002). Evidence for a decrease in PEA levels in the brain of ADHD patients have also been reported (Lewin, 2006). Taken together, these studies point to a link between trace-aminergic functioning and some clinical symptoms of the ADHD disorder.

Trace amines have also been linked to neural mechanisms underlying drug abuse and dependence. Within this context, PEA has been proposed to act as an endogenous amphetamine, being involved in brain mechanisms underlying reward and reinforcement (Janssen et al., 1999). According to this view, (1) behavioral responses to PEA resemble those seen with amphetamine; (2) experimental animals self-administer PEA; and (3) chronic administration of PEA induces behavioral sensitization (Borison, Sabelli, Maple, Havdala, & Diamond, 1978; Greenshaw, 1984; Shannon & Thompson, 1984).

Trace amines have also received much attention with respect to the etiology of affective disorders, suggesting that they maintain mental functions within “normal” limits (Reynolds, 1979). Once again, most of this attention has focused on a role for PEA. Deficits in PEA functioning/turnover are associated with depression, whereas elevated PEA functioning is associated with mania (Branchek & Blackburn, 2003; Lindemann & Hoener, 2005; Reynolds, 1979; Sabelli et al., 1974). Reserpine, a drug that can precipitate episodes of depression (Baumeister, Hawkins, & Uzelac, 2003), decreases central trace-amine levels (Boulton, Juorio, Philips, & Wu, 1977). The antidepressant effects of exercise have also been related to an exercise-induced elevation of PEA (Szabo, Billett, & Turner, 2001).

Finally, PEA has been proposed to be anxiogenic in experimental animals at lower doses than those usually required to elicit amphetamine-like responses (Lapin, 1990). These anxiogenic effects are prevented by the anxiolytic agent diazepam (Lapin, 1990). Paulos and Tessel (Paulos & Tessel, 1982) investigated the excretion of PEA following a stressful experience (parachuting). They found that the urinary excretion PEA was

markedly increased after the parachuting experience. These changes were not correlated with changes in urinary pH or creatinine excretion, suggesting that the results do not merely represent a global change in metabolism (Paulos & Tessel, 1982).

A large body of evidence links alterations in trace amines and their metabolism to a variety of clinical conditions related to monoaminergic neurotransmission. Consistent with these results, several studies suggest that the behavioral patterns that distinguish the Roman lines may be mediated, at least in part, by differences in the functional properties of their dopaminergic and serotonergic systems, including behavioral differences in emotionality, coping style, reactivity to stress, impulsivity, novelty seeking, and drug sensibility (D'Angio et al., 1988; Driscoll et al., 1985; Driscoll et al., 1990; Giménez-Llort et al., 2005; Giorgi et al., 1994; Giorgi et al., 2003; Piras, Giorgi, & Corda, 2010). According to this view, the RHA strain shows a neurobehavioral profile with cognitive and attentional anomalies characteristic of schizophrenics. For example, Fernández-Teruel et al. (Fernández-Teruel et al., 2006) using a two-way avoidance task, found a latent inhibition effect in Sprague-Dawley rats that was not observed in RHA-I animals. Additional associative learning deficits related to the schizophrenic spectrum have been described in RHA rats as compared to RLA rats, including fear classical conditioning, fear-potentiated startle response, conditioned taste aversion, and working memory (Aguilar, Escorihuela, Gil, Tobeña, & Fernández-Teruel, 2002; Aguilar et al., 2002; Aguilar et al., 2003; R. Escorihuela et al., 1997; Escorihuela et al., 1999; Fernández-Teruel et al., 1997; Martin & Bättig, 1980). Coppens et al. (Coppens et al., 2013) recently found that RLA rats showed a higher level of offensive behavior compared to RHA rats when

they were exposed to a resident-intruder test. Interestingly, aggressive and hyperactive behaviors have been linked to both, ADHD as well as to PEA dysregulation (Lindemann & Hoener, 2005). As indicated above, differences in dopaminergic neurotransmission could underlie these strain behavioral divergences, including higher levels of dopamine registered in the nucleus accumbens in response to the acute and chronic administration of psychostimulants, morphine, and ethanol; higher density of D1 dopamine receptors in the nucleus accumbens; higher stereotypic responses induced by the injection of high doses of apomorphine; and higher levels of dopaminergic prefrontal activity induced by a variety of stressors (observed in RHA-I rats compared to RLA-I rats; (Cañete, Guitart-Masip, Fernández-Teruel, Tobeña, & Giménez-Llort, 2003; Corda, Lecca, Piras, Di Chiara, & Giorgi, 1997; Corda et al., 2005; D'Angio et al., 1988; Giorgi et al., 1997; Lecca et al., 2004). Given that the trace amine system has been involved in the modulation of monoaminergic systems and neuropsychiatric conditions known to be divergent in Roman rats, the present results suggest that differences in the expression of TAAR2 could partially underlie the behavioral and neurochemical differences observed in these strains. These results are also in coherence with the findings reported in the previous microarray study (in basal condition), where another relevant gene related to the psychotic spectrum was found to be differentially expressed in Roman rats: the HOMER3 gene.

The THAP1 (domain containing, apoptosis-associated protein 1) gene was upregulated in L12-2 compared to L2-2 rats. THAP mutations are a common cause of both early- and late-onset primary dystonia, a movement disorder expressed as involuntary excessive and sustained muscle activity (Peterson, Sejnowski, & Poizner, 2010). It has been

suggested that dystonia may involve abnormalities in synaptic plasticity in the striatum through dopamine and acetylcholine neuromodulatory systems (see Peterson et al., 2010, for review). Although speculative, these results could be relevant for the understanding of the strain locomotor differences observed in a variety of experimental situations (Aguilar, Gil, Fernández-Teruel, & Tobeña, 2004; Cañete et al., 2003; Escorihuela et al., 1999; Moreno et al., 2010; Zeier, Baettig, & Driscoll, 1978). In addition, *in vitro* studies suggest that THAP1 binds to the promoter region of TOR1A and regulates its expression. This gene is also associated to primary dystonia (Gavarini et al., 2010; Kaiser et al., 2010). Interestingly, knock-in mice (KI) in TOR1A gene exhibited an enhancement in the formation of cued fear memories. Anatomical analysis also indicated that the number of *c-fos* positive cells was significantly increased while the size of the central nucleus of the amygdala was significantly reduced in these KI mice (Yokoi et al., 2009). Given that the amygdala and the hippocampus are essentials for the expression of a variety of fear/anxiety dependent associative learning tasks (including incentive loss associated phenomena) the iSNC effect observed in RLA-I rats as opposed to RHA-I rats could depend of a reward devaluation-induced increased sensitivity of the THAP1 gene in the former strain compared to the latter.

The polycystic kidney disease-like ion channel PKD2L1 was up-regulated in 12-2 RLA rats in comparison to 12-2 RHA rats. PKD2L1 receptor belongs to the TRP receptor family, and these receptors are not only found in taste cells, but also in brain cells, where they have functions as pH's receptor or proton sensor in the ventricular cerebrospinal fluid (Fuentes et al., 2010). This gene partially contributes to sour taste responses in mice at the level of fungiform papillae taste cells and whole

chorda tympani nerves. The sour taste serves to detect acid in foods and drinks, and deter animals from ingesting spoiled and unripe food sources, a function of significant importance in evolutionary terms (Horio et al., 2010). Although the implication of strain differences in sour taste sensitivity seems to be remote to the present study, some results obtained in a variety of consummatory tests (including sucrose, saccharine, and quinine solutions) could be partially explained on the basis of strain differences in palatability (Fernández-Teruel, Driscoll et al., 2002; Gómez et al., 2009; Razafimanalina, Mormede, & Velley, 1996).

The NANOS1 gene was down-regulated in L12-2 relative to L2-2 rats. This gene encodes an RNA-binding, which contains a putative zinc-finger motif that exhibits similarity with other *nanos*-class genes in vertebrates and invertebrates. NANOS1 gene has been involved in the formation of germ cells as well as in the development of the nervous system. Although NANOS1 is not detected in primordial germ cells, it is observed in seminiferous tubules of mature testis. Interestingly, maternally expressed NANOS1 is observed in substantial amounts in oocytes, but the amount of maternal RNA is rapidly reduced after fertilization, and the transient zygotic NANOS 1 expression is observed in 8-cell embryos. At 12.5 days postcoitum, NANOS 1 is re-expressed in the CNS and the expression continues in the adult brain, in which the hippocampal formation is the predominant region (Haraguchi et al., 2003). Given the relevance of the hippocampus in modulating frustration phenomena dependent on instrumental responses (Flaherty, 1996; Gray, 1987), further studies will enable us to analyze the specific role of the NANOS1 gene in the differential susceptibility of Roman rats to incentive loss experiences.

Overall, the present findings suggest that RHA-I/RLA-I differences observed in iSNC are accompanied by divergence in gene expression in the hippocampus of proteins related to schizophrenia, drug abuse, affective disorders, anxiety, fear memory, taste sensitivity, and hippocampus development. Some of these genes could underlie the differences in reward-loss reactivity observed in Roman rats, showing the utility of the microarray technique for analyzing differential gene expression as a function of divergent profiles in a given behavioral/psychological trait (Díaz-Morán et al., in press; Díaz-Morán et al., 2013; Díaz-Morán et al., 2011).

In conclusion, comparative studies in the Roman lines may help to shed light on the relationships between genotype, temperament traits, and neural mechanisms underlying the vulnerability or resistance to reward-loss experience in humans.

E. DISCUSSION

The present results suggest that an experience of frustrating, inconsistent reinforcement can reduce subsequent emotional reactions derived from reward downshift. These attenuating effects of frustration (iPRCE) seem to be observed only in those organisms especially reactive to these stressful events (that is, RLA-I rats as opposed to RHA-I rats), indicating that the vulnerability to develop behavioral, emotional, and physiological disorders induced by reward loss seems to be mediated by genetic variables.

In addition, the present studies indicate that the microarray technique allows for large-scale comparisons of gene expression profiles in

these two strains of rats psychogenetically selected on the basis of their active avoidance learning, identifying differential expression patterns in genes linked to behavioral traits shown to be differentially expressed in RHA-I vs. RLA-I rats (i.e., fearfulness, stress reactivity, novelty seeking, impulsivity, vulnerability to drug abuse, schizophrenia, affective disorders, fear memory, taste sensitivity, and hippocampal development). This molecular technology constitutes a promising approach in the study of brain-behavior relationships. The present gene-expression results lend further support to the usefulness of Roman rats for neurogenetic research of emotional traits linked to incentive loss.

It has long been common in diverse human cultures to talk about the loss of a loved one in terms of painful feelings. It is now known that this is more than poetic license, and semantic metaphor (Panksepp, 2003; Panksepp, 2005a, 2005b). The emotional pain that accompanies grief and intense loneliness shares some of the same neural pathways that generate the affective sting of physical pain (Panksepp, 2011; Papini et al., 2006).

Pain usually signals bodily injuries. However, some people experience painful feelings even when there is no immediate threat to physical integrity. Some type of activity in brain affective systems closely related to the ability to feel physical pain seems to connect these two affective states.

When social bonds are severed, social mammals experience a type of emotional distress that has the affective quality of pain. In fact, one of the most difficult forms of pain that humans, as well as other mammals, can experience is that arising from social loss (Panksepp, 1981) and ostracism

(Eisenberger, Jarcho, Lieberman, & Naliboff, 2006; MacDonald & Leary, 2005).

Physical pain and its anticipation (fear) are protective emotions that help organisms escape and avoid environmental conditions that could destroy them. Indeed, all the affect-generating state controls of the brain are ancestral or genetic “memories” that allow organisms to anticipate life-supporting and life-detracting events (Panksepp, 2011). Whereas the protective value of pain and fear conditioning suggest clear ties with fitness, one could wonder about the adaptive value of frustration: What is the function of frustration? While the environment is continuously changing, not all changes are significant. Significant changes tend to cause emotional evaluations with hedonic content. Thus, for example, in the successive negative contrast situation, the surprised devaluation of a reward generates an emotional state that largely determines the individual's behavior. The conditioning process serves to provide the necessary mechanisms to anticipate these emotional states which are significant for the organism (Papini et al., 2006). Thus, the adaptive value of these emotional states may reside in their ability to promote rapid change in both learning and performance, a process that fits Klinger's (Klinger, 1975) notion of incentive disengagement. Frustration may be conceptualized as an internal state that facilitates a switch from responses that no longer yield incentives to a search mode that may result in the discovery of needed resources. If reinforcement is thought of as inducing a kind of attachment with the site or context in which occurs, then frustration may be seen as an efficient way to break the attachment (Papini, 2003; Papini et al., 2006).

"If we rightly estimate what we call good and evil, we shall find it lies much in comparison"

John Locke, 1690

3. INTRODUCCIÓN

Las experiencias de pérdida forman parte inevitable de nuestra vida. Todos en algún momento nos hemos sentido frustrados, hemos tenido la sensación de haber perdido algo importante y de alguna forma esto nos ha dolido. Sin embargo, no es extraño oír cómo hay personas que se recuperan fácilmente de los fracasos y otras que arrastran durante años estos amargos recuerdos. Hay gente para la que algo es una gran recompensa y otra que no encuentra gratificación en la misma. ¿A qué subyacen estas diferencias? ¿Es la genética lo que las modula o es una cuestión de experiencia previa? ¿Es quizás la interacción entre ambas? ¿De qué depende el valor que damos a las cosas? ¿Este puede cambiar fruto del aprendizaje?

Algunas respuestas a estas preguntas podemos encontrarlas utilizando la investigación científica, que se acerca al estudio de este tipo de experiencias y emociones a través del empleo de modelos animales de comportamiento humano. Dichos modelos consisten en la exposición de los sujetos a situaciones vinculadas con la violación inesperada de una expectativa de recompensa. Tales situaciones a menudo han sido conceptualizadas como modelos animales de frustración (Amsel, 1994; Papini, 2006), decepción (Flaherty, 1996) ansiedad (Gray, 1987) o dolor psicológico (Papini, 2006). En efecto, existe evidencia procedente de estudios farmacológicos, neuroanatómicos y neuroendocrinos que apoyan la hipótesis de que la pérdida inesperada de un reforzador constituye un suceso negativo para el animal capaz de provocar las mismas reacciones

emocionales que el castigo o la exposición a una situación novedosa o a estímulos que provocan dolor físico (Dantzer, 1987). No obstante, son pocos los trabajos publicados que se hayan centrado en explorar estos fenómenos desde una perspectiva psicogenética, lo que supondría una ampliación del conocimiento actual acerca de las bases biológicas de las reacciones conductuales asociadas con pérdida. Es en este contexto científico donde se encuadra la presente Tesis Doctoral, cuyo objetivo fundamental se centra en el estudio conductual y genético de la frustración a través del empleo de animales genéticamente seleccionados: las ratas Romanas consanguíneas de Alta (RHA-I) y Baja Evitación (RLA-I). Estas cepas de ratas fueron seleccionadas en función de sus diferencias extremas en la ejecución de la tarea de evitación activa en dos sentidos. Como consecuencia de tal selección, estos animales presentan diferencias en rasgos comportamentales útiles para la investigación de desequilibrios emocionales relacionados con el miedo, la ansiedad, el estrés y la frustración, entre otros.

Con este objetivo general se llevó a cabo una serie experimental dirigida a ampliar la caracterización fenotípica de estos sujetos en pruebas de pérdida de recompensa, y se inició al mismo tiempo el estudio de los mecanismos genéticos que podrían subyacer a las diferencias de cepa halladas en este tipo de tareas, mediante el análisis de diferencias en expresión génica cerebral (*microarray*) bajo distintas condiciones experimentales. En este sentido, la presente Tesis Doctoral integra aproximaciones conductuales y técnicas genéticas para abordar el estudio psicobiológico de las experiencias de pérdida, tratando de comprender sus mecanismos moleculares subyacentes y sentando las bases para la investigación futura en este ámbito.

La presente Tesis Doctoral se desarrolla en los siguientes apartados. En primer lugar, se realiza una aproximación al concepto de emoción, poniendo especial énfasis en el enfoque psicobiológico y en la revisión de aquellas emociones de carácter negativo, como las de miedo y ansiedad. A continuación se exponen los principales modelos animales utilizados en el laboratorio para el estudio de dichas emociones, prestando especial atención a la revisión de los relacionados con la devaluación u omisión de una recompensa esperada. Posteriormente se analizan algunos hallazgos obtenidos en este ámbito, derivados del empleo de ratas endocriadas por cruzamiento selectivo, centrándonos principalmente en las ratas Romanas RHA-I y RLA-I. Para terminar con los antecedentes, se realiza un análisis detallado de la aplicabilidad de la técnica de *microarray* en el estudio de la ansiedad, y se comentan algunos de los hallazgos más recientes obtenidos con este tipo de técnica. Sobre la base de esta revisión y sus implicaciones teóricas y experimentales se establecen los objetivos e hipótesis generales, seguidos por el resumen y la discusión de los principales resultados experimentales hallados que aquí se presentan. Finalmente, se adjuntan los artículos donde se recogen los estudios que conforman esta Tesis Doctoral, y se indican las conclusiones generales que se derivan de los mismos.

“La cognición y las emociones no solo están estrechamente entrelazadas, sino que además, la emoción es el primer mecanismo para la racionalidad”

Antonio Damasio, 1996

4. ANTECEDENTES

A. APROXIMACIÓN PSICOBIOLOGICA AL CONCEPTO DE EMOCIÓN

La emoción constituye un concepto cargado de significados y matices subjetivos. Desde tiempos inmemoriales el ser humano ha tratado de definir este concepto mental haciendo uso de instrumentos lingüísticos y es en parte por ello que las definiciones de emoción han venido siempre acompañadas de controversia. A pesar de ser un concepto muy complejo y de las dificultades que supone su definición, todos en cierto modo sabemos qué son las emociones y la importancia que tienen. Al fin y al cabo, como afirma LeDoux (1999), se trata de los hilos que mantienen unida la vida mental. Ellas definen quiénes somos, tanto desde el punto de vista de nuestra propia mente como desde el punto de vista de otros.

Por ello no es de extrañar que el estudio de la emoción haya interesado a pensadores de casi todas las épocas. Distintos filósofos como Aristóteles, Vives o Spinoza estudiaron las emociones de forma fundamentalmente descriptiva, mucho antes del nacimiento de la Psicología como ciencia. Sin embargo, fue a partir del siglo XIX cuando por primera vez, y gracias a la obra de Charles Darwin *“La expresión de las emociones en los animales y en el hombre”* (Darwin, 1872), comienza a hacerse un estudio sistemático y más detallado de las emociones. En este trabajo pionero, Charles Darwin plantea que emociones observadas en el

hombre, como la ira o el miedo, aparecen también en otras especies inferiores y han evolucionado con una serie de funciones definidas, resultando esenciales para aumentar las posibilidades de supervivencia de los individuos (Fernández-Abascal, 2001). Gracias a estas ideas, la experimentación animal pasó a ser una estrategia de investigación imprescindible en la comprensión de la emoción humana.

El término emoción ha sido objeto de estudio de la Psicología, disciplina que ha intentado explicar cómo se desencadenan las emociones y qué relación guardan con otros procesos psicológicos (aprendizaje, memoria, percepción, atención, pensamiento, etc.), así como los procesos consecuentes derivados de las mismas (Fernández-Abascal, Martín, y Jiménez, 2003).

Durante la década de los 80, y desde el ámbito específico de la Psicología de la Emoción, se realizaron grandes esfuerzos dirigidos a clarificar este concepto. Para tal fin, distintos autores trataron de reunir todas y cada una de las dimensiones presentes en las diversas definiciones de emoción dadas hasta la fecha. Plutchik y Kellerman (1980) recogieron un total de 27 definiciones distintas, mientras que Kleinginna y Kleinginna (1981), recopilaron más de cien definiciones diferentes. En estos trabajos la mayoría de los autores realizaron definiciones operacionales que incluían, de forma explícita o implícita, el carácter multidimensional de la emoción, entendiéndola como un compuesto de tres sistemas de respuesta claramente diferenciados: el neurofisiológico-bioquímico, el motor o conductual-expresivo, y el cognitivo o experiencial-subjetivo. Para definir adecuadamente el término emoción estos tres sistemas debían estudiarse conjuntamente, puesto que cada sistema por separado reflejaría solamente una dimensión parcial de lo que es realmente la emoción (Lang, 1995).

Estos trabajos clásicos nos han llevado en la actualidad a entender las emociones como procesos multidimensionales episódicos, de corta duración, provocados por la presencia de algún estímulo o situación interna o externa que ha sido evaluada y valorada como potencialmente capaz de producir un desequilibrio en el organismo. Tales procesos dan lugar a una serie de respuestas subjetivas, cognitivas, fisiológicas y expresivas que están íntimamente relacionadas con el mantenimiento del equilibrio, es decir, con la adaptación de un organismo a las condiciones específicas del medio ambiente en continuo cambio (Martínez-Sánchez, Fernández-Abascal, y Palmero, 2002).

La estrecha relación existente entre los cambios psicofisiológicos y la experiencia emocional fue puesta de manifiesto ya por William James a finales del siglo XIX (véase Román y Sánchez-Navarro, 2008) adelantándose mucho a su tiempo y al nuestro. Este fisiólogo comenzó a considerar las emociones como sensaciones procedentes de los cambios fisiológicos (aumento o disminución de la presión sanguínea, frecuencia cardíaca y tensión muscular) producidos por la percepción de un estímulo externo o situación, abriendo paso a una nueva línea de investigación centrada en la importancia de los cambios psicofisiológicos para explicar la naturaleza de la experiencia emocional (Fernández-Abascal, 2001; Fernández-Abascal et al., 2003). No obstante, esta teoría sufrió muchas críticas, pues aunque funcionaba bien para la explicación de las emociones primarias, no lo hacía para las secundarias, al descartar por completo el componente evaluativo-cognitivo de las mismas.

Así, a principios del siglo XX esta propuesta fue reformulada por Cannon (véase Aguado, 2005). Este autor superó la idea bifásica de James al proponer más allá de la secuencialidad, una bidireccionalidad entre

componentes psicofisiológicos y cognitivos. Cannon planteó una gran limitación a la teoría de James: al existir emociones con idénticos correlatos fisiológicos, si éstos fueran los responsables últimos de la discriminación emotiva, entonces el organismo encontraría serios problemas para interpretar los signos corporales y otorgarles un valor emocional definido o distintivo. Este autor además abogó por un nuevo modelo neurológico centrado en la función reguladora del tálamo y del hipotálamo sobre la actividad de la corteza cerebral y del sistema nervioso periférico (Kandel y Kupfermann, 1997).

Las aportaciones de estos autores tuvieron una importancia decisiva en el curso de la investigación sobre el cerebro y la emoción, motivando así a otros investigadores a continuar con el estudio de las bases neuroanatómicas de las emociones. En este contexto, destacan los trabajos realizados por Papez (1937; citado en Rosselló y Revert, 2008), quien defendía la existencia de una serie de núcleos interconectados que formaban una especie de circuito cuya activación daba lugar a la aparición de emociones directamente relacionadas con la supervivencia, como el miedo. Dicho circuito, conocido como circuito de Papez, incluía algunas de las regiones filogenéticamente más antiguas del encéfalo, como el hipotálamo, el tálamo anterior, el hipocampo y la corteza cingulada (LeDoux, 1999).

De manera casi simultánea a la propuesta de Papez acerca de la importancia de estas estructuras para la integración del comportamiento emocional, Klüver y Bucy (1937; citado en Purves, 2007) llevaron a cabo una serie de experimentos con monos *rhesus* en los que encontraron profundas alteraciones en la conducta emocional de los primates tras la

extirpación bilateral de los lóbulos temporales mediales, incluyendo a la amígdala (Purves, 2007).

Los avances en la investigación de las bases neuroanatómicas de la emoción se vieron interrumpidas por la Segunda Guerra Mundial, hasta que en 1949 volvieron a ser retomadas por MacLean (1949; citado en LeDoux, 1999). Este investigador, partiendo de las ideas que en su teoría propuso Papez, así como de los hallazgos de Klüver y Bucy, incluyó en su formulación otras estructuras cerebrales adicionales a las ya mencionadas, como el área septal, el núcleo accumbens, la corteza prefrontal y la amígdala (Aguado, 2005; LeDoux, 1999; Purves, 2007), y acuñó el término de sistema límbico para denominar a este conjunto de estructuras. Las aportaciones realizadas por MacLean permitieron destacar la importancia de la corteza prefrontal y la amígdala, dos estructuras cerebrales que no habían sido incluidas por Papez en los primeros estudios anatómicos y que, en la concepción moderna del sistema límbico, constituyen la clave para comprender la naturaleza de la experiencia emocional (véase para una revisión, Kolb y Wishaw, 2006).

Desde el campo de la Neurociencia Cognitiva se considera que emoción y cognición son dos funciones que se hallan íntimamente relacionadas y que, probablemente, comparten sus sistemas neurales (Kolb y Wishaw, 2006). En la actualidad, es esta aproximación teórica una de las que gozan de mayor auge en el ámbito de la emoción. En este contexto, dos de las principales líneas de pensamiento con respecto al estudio neurocientífico de la emoción vienen representadas por la hipótesis del marcador somático de Damasio (2007) y por la teoría de la interacción cognitivo-emocional de LeDoux (2000). En ambas teorías está implícita la consideración de que emoción y cognición son dos conceptos que se

solapan y a los que subyace una circuitería neural común e interrelacionada.

Desde la hipótesis del marcador somático de Damasio (2007) las emociones pueden entenderse como un conjunto de cambios corporales que incluyen cambios en el sistema motor, en el sistema nervioso y en el endocrino (denominados *marcadores somáticos*). Tales cambios aparecen en respuesta a la evaluación de un fenómeno externo. La aportación más relevante de esta formulación, en contraste con el resto de teorías neurobiológicas, es que el autor especifica que el control de las emociones, además de residir en estructuras límbicas, también se localiza en otras estructuras como la corteza prefrontal, región que tiene un papel fundamental en la toma de decisiones (Damasio, 1998). Por tanto, las emociones y los sentimientos no son unos intrusos en el bastión de la razón sino que, por el contrario, determinados aspectos del proceso de la emoción son indispensables para la racionalidad. El autor, además, resalta la importancia que tienen los “instintos” al tomar las decisiones, y por ello sus hallazgos están siendo tenidos en cuenta en los últimos años en el campo de la inteligencia artificial. Así, si bien los primeros programas de inteligencia artificial lograron configurar con éxito los procesos lógicos, los más recientes han superado este planteamiento puramente cognitivo y en algunos hasta se intentan representar aspectos de las emociones (Taylor, Scherer, y Cowie, 2005).

Por su parte, LeDoux considera que muchas emociones son producto de la sabiduría evolutiva, que probablemente sea más inteligente que todas las mentes humanas en conjunto. Así, la idea general de la teoría de LeDoux (1999) radica en que las emociones evolucionaron para mejorar la supervivencia de los animales y, con la evolución del cerebro, los

procesos cognitivos y emocionales se interrelacionaron progresivamente. En contraste con Damasio, LeDoux no trató de explicar todas las emociones, sino que eligió el miedo como ejemplo para estudiar las relaciones entre el cerebro y la conducta, emoción que puede estudiarse tanto en los animales como en el hombre por medio del paradigma de condicionamiento clásico del miedo (LeDoux, 1998). La estructura clave para que tenga lugar este tipo de condicionamiento es la amígdala (LeDoux, 2007) a la que atribuye funciones de valoración primaria sobre estímulos emocionalmente relevantes para el organismo. Esta región envía señales hacia la hipófisis y el tronco cerebral para estimular la liberación de hormonas y activar el sistema nervioso autónomo, generándose así una emoción que interpretamos como miedo (Cain y LeDoux, 2008). Así pues, este autor demostró la existencia de vías que transmiten la información sensorial desde el tálamo a la amígdala, sin intervención primaria de los sistemas corticales, lo que se puede interpretar como evidencia de que existe un procesamiento emocional pre-cognitivo.

Paralelamente a estos enfoques teórico-experimentales, el avance que se ha producido en las últimas décadas en el conocimiento de las bases neurobiológicas de las emociones se debe a contribuciones como las que se comentan a continuación.

En primer lugar, deben destacarse los estudios realizados con humanos desde diversas disciplinas, como la Psicología, la Neurociencia, la Inteligencia Artificial y la Robótica (Taylor et al., 2005). Gracias a esta colaboración interdisciplinar se ha podido profundizar en el conocimiento de la naturaleza de las emociones (Ekman, 1999) y su interacción con la cognición y la atención (Taylor et al., 2005); el funcionamiento físico del cerebro humano a través del empleo de redes neuronales artificiales

(Taylor y Fragopanagos, 2005) y de técnicas de neuroimagen (Aleman, Swart, y van Rijn, 2008); y finalmente, la validación de distintos modelos teóricos sobre emoción por medio del uso de máquinas inteligentes (Cañamero, 2005).

En segundo lugar, el desarrollo de modelos elementales de comportamiento emocional en animales ha permitido también una aproximación al estudio de las emociones en el ser humano. La investigación con animales ha gozado de una amplia tradición en el campo de la investigación neurocientífica, y en ocasiones ha proporcionado ejemplos más elaborados de la relación existente entre la actividad de sistemas cerebrales específicos y conductas relevantes desde el punto de vista de la emoción (Aguado, 2005; Escorihuela y Fernández-Teruel, 1998). Hay que tener en cuenta que los estudios sobre los fundamentos neurológicos de las emociones en las personas son muy difíciles de realizar por razones tanto éticas como prácticas. La experimentación con animales es, por tanto, un recurso útil y necesario para entender las emociones. La comprensión de este fenómeno en el cerebro humano es una tarea de gran importancia, puesto que la mayoría de los trastornos mentales suelen ser tener un importante componente emocional (LeDoux, 1999).

Por todo, resulta oportuno situar la cognición dentro de su contexto mental y reconciliar la cognición y las emociones en la mente. La mente tiene pensamientos y emociones, y el estudio de unos excluyendo otros nunca será totalmente satisfactorio. A fin de cuentas, la subjetividad de los estados emocionales que ha servido de pretexto para esquivar su estudio científico ha perdido gran parte de su fundamento. Y es que en realidad, la subjetividad que pueda tener la experiencia de una emoción no es mayor o menor que la que pueda tener la del color rojo de una manzana o la del

recuerdo de haber comido una. Sin embargo, el estudio de la percepción o la memoria visual no se ha visto interrumpido por este hecho, y por ende tampoco debe ocurrir con el estudio de las emociones (Damasio, 2007).

B. EMOCIONES NEGATIVAS: MIEDO Y ANSIEDAD

De entre todas las emociones básicas, sin duda el miedo y la ansiedad son las que más atención e interés han suscitado entre los investigadores y teóricos a lo largo de la historia de la Psicología. Los psicobiólogos solían estudiar la ansiedad considerándola como una emoción fundamental, similar al miedo y con un claro valor adaptativo (Hommer, Skolnick, y Paul, 1987), ya que ambos tendrían como función principal preparar al organismo para llevar a cabo acciones dirigidas a salvaguardarlo de amenazas potenciales procedentes de su medio ambiente. A pesar de que, en efecto, el miedo y la ansiedad se han considerado con frecuencia como emociones similares, al compartir algunas características comunes y pertenecer a la misma esfera afectiva, en la actualidad la mayoría de los investigadores utilizan estos términos para referirse a emociones diferentes, por lo que conviene tener presente los principales aspectos diferenciales entre ambas (véase para una revisión, Carpi, Guerrero, y Palmero, 2008; Fernández-Abascal, 2001).

En primer lugar, y en relación con el estímulo desencadenante, los términos de miedo y ansiedad se han diferenciado porque el primero se asocia a algún tipo de estímulo externo amenazante e identificable, mientras que en la ansiedad no existe una fuente externa de amenaza reconocible, o bien el desencadenante es más vago, impreciso y menos comprensible que en el miedo (Clare y Ortony, 2000; Lang, Davis, y Öhman, 2000).

En segundo lugar, y en relación con la reacción psicofisiológica, el miedo que se produce ante un peligro real y concreto desencadena una reacción fisiológica que dura un breve periodo de tiempo (segundos), con una intensidad que es proporcional al estímulo que desencadenó tal emoción. Sin embargo, en el caso de la ansiedad, tal reacción se mantiene en el tiempo de forma desproporcionada respecto de la peligrosidad del estímulo desencadenante (Carpi et al., 2008; Fernández-Abascal, 2001).

En tercer lugar, y en relación con el tipo de respuesta que se pone en marcha, el miedo puede entenderse como un impulso (*drive*) que motiva la conducta de evitación (o escape) ante la percepción de un estímulo de amenaza, mientras que la ansiedad sería un estado emocional de miedo no resuelto o un estado de activación que no posee una dirección específica tras la percepción de amenaza (Epstein, 1972; Sandín y Chorot, 1995).

En cuarto lugar, y en relación con su funcionalidad, el miedo se caracteriza por presentar un componente más primigenio y en cierto modo más automático, al encargarse de dirigir la atención hacia el peligro y funcionar como un sistema de alarma-defensa, mientras que la ansiedad es fundamentalmente de naturaleza cognitiva y posee la capacidad de anticipar o señalar un peligro o amenaza futura para el propio individuo (Barlow, 2004). Esto confiere a la ansiedad un valor funcional importante, ya que posee una utilidad adaptativa que, no obstante, se convierte en desadaptativa cuando se anticipa un peligro irreal, como ocurre en la ansiedad clínica.

Como puede comprobarse, el miedo y la ansiedad tienen componentes ambientales, fisiológicos, conductuales y funcionales diferentes. En este sentido, Gray y McNaughton (2000) han propuesto una

diferenciación entre miedo y ansiedad desde una perspectiva funcional, comportamental, farmacológica y neural basada en el análisis de la respuesta defensiva (Blanchard, Griebel, Henrie, y Blanchard, 1997). Según estos autores, el miedo tiene la función de movilizar al animal lejos del peligro, activando conductas de lucha, huida e inmovilización (*freezing*), mientras que la ansiedad tiene la capacidad de dirigir al animal hacia el peligro, produciéndose así un aumento de la valoración del riesgo y como consecuencia un incremento de la quietud defensiva. Las manifestaciones comportamentales de la ansiedad serían sensibles a la acción de fármacos ansiolíticos, mientras que las del miedo serían insensibles a dicha acción. Al mismo tiempo, el modelo incluye un sistema de estructuras cerebrales jerarquizadas, formado por la sustancia gris periacueductal, el hipotálamo, la amígdala, el giro del cíngulo y la corteza prefrontal, que se activarían en mayor o menor medida dependiendo de que la situación implique evitación defensiva (miedo) o aproximación defensiva (ansiedad) (Gray y McNaughton, 2000; McNaughton y Corr, 2004; véase Tabla 1).

Tabla 1.- Sistemas neurales del procesamiento de estímulos
(adaptado de Gray y McNaughton , 2000; McNaughton y Corr, 2004)

SISTEMA	TIPO DE AMENAZA	EFFECTOS CONDUCTUALES	REPERTORIO CONDUCTUAL	ESTRUCTURAS NEURALES SUBYACENTES	FARMACOLOGÍA ASOCIADA
Lucha/Inmovilización/ Escape	Peligro explícito evitable del que se puede escapar	Castigo o no-refuerzos incondicionados	Huída, agresión defensiva, petrificación y actividad autonómica asociada	Amígdala e hipotálamo	Sensibilidad a los opiáceos
Sistema de Aproximación Conductual (SAC)	No interpretación de presencia de estímulos amenazantes	Arousal apetitivo, facilitación de procesos de reforzamiento	Reforzamiento positivo, aproximación a señales de seguridad, secuencias de respuestas flexibles	Sistema mesolímbico (dopaminérgico)	Opioides endógenos
Sistema de Inhibición Conductual (SIC)	Estímulos de castigo secundario (estímulos condicionados aversivos) y frustración condicionada	Aspectos cognitivos del procesamiento de la información de la ansiedad. Control de la actividad hipocampal <i>theta</i>	Supresión de la aproximación, de la evitación y elicitación de la conducta de evaluación de riesgo	Formación hipocampal, área septal y estructuras cortico-límbicas relacionadas (Sistema septohipocámpico;SHS)	Ansiolíticos (Benzodicepinas)

Nota: Modelo de Gray y McNaughton (2000). Sistemas que regulan la conducta del individuo en función de la naturaleza de la amenaza, los efectos conductuales que conlleva, los comportamientos que elicit, así como las estructuras cerebrales implicadas y la farmacología que les subyace

A pesar de las diferencias comentadas, cuando se aborda el análisis científico de las emociones de miedo y ansiedad a través de la experimentación animal, tales diferencias comienzan a diluirse, debido a que la mayoría de los modelos animales que se han empleado tradicionalmente, sean de miedo o de ansiedad, no se han derivado de teorías capaces de integrar los hallazgos de estudios neurales, farmacológicos y conductuales (McNaughton y Zangrossi, 2008) tal y como se requiere de una teoría neuropsicológica del miedo y la ansiedad (McNaughton y Corr, 2004). No obstante, se han desarrollado una amplia variedad de modelos animales que, sin duda, han sido de gran utilidad para avanzar en el conocimiento científico de estas emociones. Esto ha sido posible dado que, a pesar de que las especies puedan tener sus propios modos de respuesta ante el peligro, la similitud de sus patrones funcionales es la norma. De hecho, lo que distingue al hombre de otros animales respecto de las reacciones de miedo no es el modo en que se expresa, sino los diferentes tipos de estímulos desencadenantes que activan el mecanismo de evaluación del sistema de defensa. Por tanto, el uso de la experimentación animal resulta tanto práctico como eficaz para la comprensión del funcionamiento del mecanismo del miedo en el ser humano.

C. MODELOS ANIMALES DE ANSIEDAD

La investigación animal constituye una aproximación muy útil para estudiar científicamente el miedo y la ansiedad a través de sus fenómenos conductuales asociados, permitiendo una manipulación ambiental precisa y una medición controlada de las respuestas inducidas por dicha manipulación. Un modelo animal puede definirse como aquella preparación

experimental que se desarrolla en una especie con el propósito de estudiar fenómenos que tienen lugar en la misma u otras especies (Ramos, 2008). La mayoría de los modelos animales de miedo/ansiedad consisten en situaciones experimentales controladas en las que el repertorio de conductas mostradas por el animal, indicativas de un estado de ansiedad, son empleadas para estudiar esta emoción en el ser humano (Lister, 1990; Ramos, 2008). Los modelos animales que se utilizan en el ámbito de la Psicobiología se han desarrollado sobre la base de sólidos supuestos evolucionistas, asumiendo que los determinantes genéticos, neurales, ambientales y farmacológicos de la conducta animal son comparables a aquellos que determinan el comportamiento humano, en su versión tanto normal como patológica (Kalueff, Wheaton, y Murphy, 2007; Pawlak, Ho, y Schwarting, 2008; Schmidt y Müller, 2007). Así, se acepta que el miedo es omnipresente, es decir, que todas las especies se enfrentan a amenazas y peligros en su ambiente que generan respuestas que aumentan la probabilidad de supervivencia del individuo. Además, la conducta de defensa del hombre parece tener un largo pasado evolutivo, dado que muestra similitudes importantes con la de otras especies. En efecto, sólo existe una cantidad limitada de estrategias a las que los animales (incluido el ser humano) pueden recurrir para defenderse del peligro: retirada o huida, inmovilización, agresión defensiva o sumisión. Estas respuestas se manifiestan de un modo u otro dependiendo de las características de la situación (naturaleza del estímulo amenazante, distancia, experiencia previa, etc.). Más aún, el estudio del miedo animal puede ser de enorme utilidad no sólo para la investigación básica, sino también para la práctica clínica, dado que, si bien esta emoción tiene importantes funciones adaptativas, sentir un temor excesivo o inapropiado puede ser el origen de numerosos problemas psiquiátricos. Estas consideraciones justifican la

investigación con modelos animales, dado que el miedo está programado genéticamente en todos los organismos, incluido el ser humano (LeDoux, 1999).

Los modelos animales de ansiedad consisten en situaciones experimentales en las que los animales muestran conductas supuestamente indicativas de un estado de ansiedad subyacente. En este sentido, se ha establecido una distinción entre los distintos tipos de modelos animales con base en la respuesta condicionada o incondicionada que se genera tras la presentación del estímulo aversivo (véase para una revisión, Rodgers, 1997; Rodgers, Cao, Dalvi, y Holmes, 1997). Los modelos de ansiedad condicionada implican el emparejamiento de una respuesta incondicionada con un estímulo aversivo, modelando así reacciones a acontecimientos específicos negativos o a estímulos emparejados con éstos (Cárdenas y Navarro, 2005). La etiología de la ansiedad bajo estas condiciones sería comparable a la ansiedad patológica en humanos, que implicaría una sobrerreacción a acontecimientos que, en condiciones normales, no tendría lugar. Por otro lado, los modelos animales de ansiedad incondicionada abarcan toda una serie de observaciones sobre conductas espontáneas (no aprendidas) de los animales ante distintas situaciones potencialmente amenazantes. Así, por ejemplo, ambientes en los que existe novedad provocan en el animal miedo y curiosidad, considerándose más o menos ansiogénicos en función de la exploración que el animal realice de los mismos (Cárdenas, 2002).

Una aproximación diferente aunque complementaria a la anterior se basa en clasificar a los modelos en función del tipo de estímulos capaces de desencadenar reacciones de ansiedad en el sujeto experimental. Muchos de estos estímulos tienen la capacidad para generar un conflicto entre

tendencias motivacionales y conductuales opuestas (McNaughton y Corr, 2004). Los modelos de conflicto más elementales implican la exposición del animal a una situación en la que tiene lugar la presentación simultánea de un estímulo apetitivo –agua o comida– y uno aversivo –una descarga eléctrica– tras la ejecución de una misma respuesta, bien sea operante o consumatoria (Geller y Seifter, 1960; Rodgers, 1997; Rodgers et al., 1997). Tras una experiencia de este tipo, aparece un estado de conflicto en el animal, que oscila entre dar la respuesta de aproximación o la de evitación. Este conflicto se traduce finalmente en la inhibición de la conducta en curso, lo que a su vez se utiliza como evidencia de un estado de ansiedad, que es atenuado por la administración de sustancias ansiolíticas (Gray, 1987).

Continuando con los modelos basados en situaciones de conflicto, se sabe que la exposición de un animal a una situación estimular novedosa provoca temor, y al mismo tiempo una tendencia natural a la exploración del ambiente, activando conductas dirigidas a la familiarización con el mismo. Basándose en esta tendencia exploratoria, los modelos relacionados con la exposición a estímulos novedosos utilizan, además, la presentación simultánea de estímulos aversivos (por ejemplo una luz intensa, un espacio abierto, una descarga eléctrica de la que no es posible escapar, la presencia o señales de un predador, etc.) para generar en el animal un estado de miedo que entra en conflicto con la respuesta exploratoria y acaba inhibiéndola, aumentando al mismo tiempo algunas conductas indicativas de miedo o ansiedad (como por ejemplo el número de defecaciones, la inmovilización, la huida o la evitación; Rodgers, 1997; Rodgers et al., 1997). Partiendo de estas observaciones se han desarrollado diferentes modelos animales, como la prueba de campo abierto (Alstott y

Timberlake, 2009), los tests de interacción social (Varlinskaya y Spear, 2008), o el laberinto elevado (Escarabajal, Torres, y Flaherty, 2003), entre otros.

Finalmente, los modelos relacionados con reducción u omisión de una recompensa esperada son aquellos en los que el conflicto se produce por la violación de una expectativa de recompensa, bien por la omisión inesperada de un reforzador apetitivo previamente presentado, bien por la reducción en la magnitud o en las cualidades del mismo. Por su especial relevancia para la presente Tesis Doctoral, estos modelos se revisan con detalle a continuación.

Las experiencias de pérdida de recompensa constituyen una de las principales fuentes de estrés emocional y de conflicto a las que se enfrenta el ser humano a lo largo de su vida. En numerosos estudios clínicos que se interesan por identificar y ordenar la intensidad de los eventos vitales estresantes que afectan a la población general, aparecen con frecuencia sucesos que implican de un modo u otro la pérdida o devaluación de reforzadores significativos para el individuo, tales como la muerte de un ser querido, la enfermedad, el desempleo, la disminución del salario, etc. (Scully, Tossi y Banning, 2000; en Papini et al., 2006). Estos acontecimientos vitales pueden desencadenar desequilibrios conductuales, fisiológicos y hormonales, siendo el origen de alteraciones psicofisiológicas como el trastorno por estrés postraumático, caracterizado por un aumento de la activación simpática, sentimientos de miedo intenso y de indefensión, alteración del funcionamiento social y ocupacional, y recuerdo persistente de la experiencia traumática (Kamenetzky et al., 2009; Papini et al., 2006).

Numerosas evidencias obtenidas en el laboratorio animal indican que la devaluación inesperada de la calidad o cantidad de un reforzador apetitivo previamente presentado desencadena un estado fisiológico, cognitivo y comportamental característico que algunos autores denominan frustración (Amsel, 1992). Este estado involucra mecanismos emocionales semejantes a los inducidos por la presentación de estímulos aversivos (relacionados, por ejemplo, con el dolor físico y la novedad), desencadenando respuestas similares a aquellas que el estrés desencadena debido a la activación de circuitos cerebrales comunes relacionados con el miedo y la ansiedad (Gray y McNaughton, 2000; Papini y Dudley, 1997). Esta hipótesis ha sido apoyada por numerosos estudios conductuales, farmacológicos y neurofisiológicos (Gómez, Morón et al., 2009; Mustaca y Papini, 2005). Dentro de los modelos animales relacionados con la devaluación u omisión de una recompensa esperada se incluyen fenómenos de aprendizaje como el contraste sucesivo negativo (CSN) y la extinción, así como otros efectos relacionados con la resistencia o persistencia conductual que se observa cuando el sujeto es expuesto a condiciones experimentales en las que se combina la presentación y la omisión del reforzador (reforzamiento parcial; Cuenya et al., 2011; Gómez et al., 2008).

Los modelos animales de omisión de recompensa han puesto de manifiesto que la eficacia de un reforzador concreto no depende únicamente de sus propiedades físicas, sino también de la experiencia previa que el sujeto haya tenido con diferentes niveles de recompensa (Leszczuk y Flaherty, 2000). Así, por ejemplo, el CSN consiste en una reducción o deterioro transitorio en la respuesta que aparece ante bajos niveles de recompensa en animales que previamente han sido expuestos a valores de recompensa superiores (Domjan, 2006; Mackintosh, 1974). El

efecto básico de CSN se obtiene al comparar la ejecución de este grupo devaluado con la de un grupo control que siempre recibe bajos niveles de recompensa (Pellegrini, Wood, Daniel, y Papini, 2005), siendo esta ejecución inferior en el primer grupo en comparación con el segundo.

El efecto de CSN ha sido observado en una gran variedad de especies (Mustaca, Bentosela, y Papini, 2000; Papini, 2003), usando reforzadores tanto sólidos como líquidos (Pellegrini y Mustaca, 2000) y exponiendo a los sujetos a la reducción tanto de la cantidad como de la calidad del reforzador presentado (Crespi, 1942; Mitchell y Flaherty, 2005). El deterioro conductual que define el fenómeno de contraste ha sido observado, además, en tareas tanto consumatorias (Flaherty, 1996), como instrumentales apetitivas (Crespi, 1942) e instrumentales aversivas (Cándido, Maldonado, Megias, y Catena, 1992). En tareas consumatorias (CSNc) este fenómeno suele obtenerse analizando el efecto que tiene la manipulación en la concentración bien de una determinada solución azucarada (Flaherty, 1996), bien de un reforzador sólido (Pellegrini y Mustaca, 2000) sobre, por ejemplo, la frecuencia con que los animales lamen una bureta que contiene dicha solución. Así, dicho efecto aparece cuando se reduce la magnitud del reforzador al que los animales han tenido acceso, lo que provoca una clara reducción en la frecuencia de lametones (véase para una revisión, Flaherty, 1996). El efecto de CSN también puede observarse manipulando la magnitud de un reforzador asociado con la ejecución de una respuesta instrumental (CSNi). Así, por ejemplo, dicho efecto aparece cuando se reduce el número de *pellets* a los que los animales tienen acceso en la caja meta de un laberinto recto (Crespi, 1942) o también cuando se reduce el tiempo de permanencia en el lugar de seguridad en la tarea de evitación en un solo sentido (Cándido et al., 1992).

A pesar de su vigor, el CSN puede verse influido por numerosas variables entre las que destacan la diferencia entre las magnitudes de recompensa, el número de ensayos que componen la primera fase previa al cambio, el tipo de ensayos empleado (masivos o espaciados), el intervalo establecido entre la última experiencia con la primera recompensa y la primera con la segunda, el nivel de privación de los animales, o el uso de sustancias ansiolíticas (Black, 1968; Dachowski y Brazier, 1991; Daly, 1974; Flaherty, 1991, 1996; Grigson, Spector, y Norgren, 1993; Mackintosh, 1974).

Por otro lado, se sabe que las experiencias repetidas de frustración pueden llegar a inmunizar al animal ante posteriores experiencias inesperadas de pérdida, generando conductas de persistencia que reflejan su resistencia a la frustración (Papini, 2006). Así, el efecto del reforzamiento parcial en la extinción (ERPE) es el fenómeno que se obtiene al reforzar una determinada respuesta sólo en algunos ensayos, normalmente el 50%, durante una primera fase de adquisición. Tras ésta, la recompensa se suprime (fase de extinción). El ERPE puede observarse mediante la comparación de la ejecución de este grupo con la de otro grupo igualmente suprimido de recompensa, pero que ha sido sometido a un programa de reforzamiento continuo durante la fase de adquisición. El resultado obtenido es una extinción más lenta, es decir, una mayor resistencia a la extinción, en el grupo de reforzamiento parcial en comparación con el grupo de reforzamiento continuo (Domjan, 2006; Mackintosh, 1974).

Resultados similares se obtienen cuando, tras un entrenamiento en reforzamiento parcial, el animal es sometido posteriormente a la devaluación (en lugar de a la omisión) de la misma. Este es el llamado

efecto del reforzamiento parcial en el contraste (ERPC), que consiste en una atenuación del mismo que aparece en aquellos animales que han tenido experiencia previa con reforzamiento parcial, en comparación con la de aquéllos sometidos a condiciones de reforzamiento continuo durante la fase de precambio (Pellegrini et al., 2004).

Estos fenómenos de aprendizaje han sido analizados desde diferentes perspectivas teóricas, la mayoría de las cuales defienden su naturaleza emocional. Algunas de las teorías más relevantes son las de Amsel (1992), Gray (1987), Flaherty (1996), o Norris, Daniel, y Papini (2008). La teoría de la frustración de Amsel (1992, 1994), por ejemplo, surgió de la hipótesis planteada por Crespi (1942), quien sostenía que la reducción en la magnitud de una recompensa producía un deterioro comportamental en el sujeto que era el resultado de una reacción emocional negativa provocada por dicha reducción (Domjan, 2006). Esta teoría ha tenido un papel fundamental en el estudio del aprendizaje animal y su relación con la motivación y la emoción, permitiendo esclarecer los mecanismos que subyacen a una gran variedad de fenómenos paradójicos del refuerzo, como el ERPE, las conductas de persistencia, o el CSN (Amsel, 1992, 1994; Baquero y Gutiérrez, 2007). En concreto, la teoría de Amsel sugiere que la violación de una expectativa de recompensa produce inicialmente un estado emocional aversivo denominado frustración primaria (Amsel, 1992). Dicho estado de frustración puede asociarse con las claves contextuales presentes en la situación experimental, ocasionando la aparición de una frustración secundaria o condicionada que coexiste con las expectativas de recompensa que también provocan estos estímulos. De este modo, se produciría un conflicto de aproximación-evitación que sería

el responsable del deterioro conductual que caracteriza al fenómeno de CSN (Amsel, 1994).

La frustración secundaria también está presente durante el entrenamiento en reforzamiento parcial, en el cual la respuesta unas veces es seguida de recompensa y otras de su ausencia. Esta teoría asume que durante los ensayos reforzados el animal se forma una expectativa de reforzamiento al final del laberinto. Por otro lado, la ausencia de recompensa en los ensayos no reforzados generaría la aparición de un estado emocional de frustración. De este modo, tras la experiencia repetida en reforzamiento parcial el sujeto desarrollaría simultáneamente una expectativa de no reforzamiento (o de frustración anticipatoria) y de reforzamiento, generándose un estado de conflicto en el animal, que oscilaría entre dar la respuesta de aproximación o la de retirada de dicho compartimento. Dado que la respuesta de aproximación acaba siendo reforzada en algunos ensayos, tanto la expectativa de reforzamiento como la expectativa de frustración actuarían como estímulos discriminativos que facilitarían la ejecución de la respuesta de aproximación, provocando así la persistencia comportamental que se observa durante la fase de extinción. Por lo tanto, los animales sometidos a una experiencia de reforzamiento parcial tienden a mantener la respuesta de aproximación a causa de este mecanismo de contracondicionamiento de la frustración anticipatoria (véase Flaherty, 1985; Mackintosh, 1974).

Otra de las teorías más relevantes desarrollada en el presente contexto es la propuesta por Flaherty, quien conceptualizó el CSN como una situación típica de conflicto similar a las que se utilizan en numerosos modelos animales de ansiedad. Flaherty propone una hipótesis dinámica y por etapas para explicar dicho fenómeno conductual. En primer lugar, el

animal debe detectar que se ha producido un cambio en la magnitud del incentivo. Esta detección implica la comparación de la recompensa actual con el recuerdo de la anterior (basado este último en la formación de una expectativa de recompensa). Estos procesos de comparación necesitarían de cierta cantidad de tiempo y experiencia, y podrían verse acompañados de una reacción inicial de rechazo de la nueva recompensa y de búsqueda de la anterior. Una vez evaluado el valor del refuerzo devaluado y comprobado que no existe otro disponible, el animal entraría en una fase de conflicto en la que oscilaría entre el acercamiento y consumo del mismo -por su valor reforzante absoluto- y la evitación -por sus propiedades relativas- (Flaherty, 1996).

Un planteamiento teórico reciente dirigido a explicar los fenómenos relacionados con reducción u omisión de recompensa es el que propone Papini (2003, 2006, 2009). Según este investigador, cuando se produce una reducción en el valor de un incentivo (por devaluación u omisión) se provoca la violación de una expectativa de recompensa, lo cual provoca un ajuste comportamental en el organismo expuesto a esta experiencia. Esta adaptación a la nueva situación depende al menos de dos procesos de aprendizaje. Un primer proceso, denominado aprendizaje aloentróico, permite que el animal aprenda acerca de los cambios que se han dado en su medio ambiente y ajuste su conducta de acuerdo con dichos cambios. Y un segundo proceso, llamado aprendizaje egocéntrico, que permite al organismo aprender de su propia reacción emocional, adquiriendo al mismo tiempo la capacidad de anticiparla (Papini, 2003, 2006). En términos de las teorías más tradicionales, el aprendizaje aloentróico estaría relacionado con las expectativas de reforzamiento, mientras que el aprendizaje egocéntrico se referiría a la respuesta emocional de frustración

que tendría lugar en este tipo de situaciones (Amsel, 1992; Norris et al., 2008).

Todas estas teorías parten del supuesto teórico de que la pérdida inesperada de un reforzador constituye un suceso aversivo para el animal capaz de provocar reacciones emocionales negativas que comparten similitudes con las inducidas por otros eventos estresantes, como el castigo o la exposición a una situación novedosa (Dantzer, 1987). Este supuesto ha sido respaldado por una gran variedad de datos experimentales de índole conductual, neuroendocrina, farmacológica y neuroanatómica, que evidencian las relaciones entre la frustración (o dolor psicológico), el dolor físico y la ansiedad (Cuenya, Kamenetzky, y Mustaca, 2008). Así, los estímulos condicionados asociados con ausencia de recompensa, al igual que los asociados con un evento aversivo como por ejemplo una descarga eléctrica, vigorizan respuestas de escape, agresión y sobresalto; provocan un patrón de activación fisiológica equiparable al observado durante el castigo; y sus efectos conductuales pueden atenuarse mediante la acción de fármacos ansiolíticos. En este sentido, por ejemplo, la administración de benzodiazepinas, barbitúricos o etanol atenúa el CSN, aumentan la resistencia a la extinción y anulan el ERPE en numerosas situaciones experimentales, explicándose estos resultados sobre la base de las propiedades ansiolíticas de estas sustancias (Becker y Flaherty, 1982; Dantzer, 1987; Gray, 1987; Leslie et al., 2004; Thomas y Papini, 2003). Además, la exposición a este tipo de situaciones, en las que se produce una reducción en el valor del incentivo, activa el eje HHA, aumentando los niveles de hormonas relacionadas con el estrés, como la adrenocorticotropa (ACTH) y la corticosterona (Earley y Leonard, 1979; Kawasaki y Iwasaki, 1997; Mitchell y Flaherty, 1998; Romero, Levine, y

Sapolsky, 1995). Finalmente, la lesión cerebral de estructuras relacionadas con emoción y motivación interfiere con la aparición de fenómenos de pérdida de reforzamiento. Así, por ejemplo, lesiones hipocampales alteran el efecto de CSNi, pero no el CSNc (Flaherty, Coppotelli, Hsu, y Otto, 1998). El núcleo accumbens se ha mostrado también necesario en la aparición del efecto de CSNi, pero no en el CNSc (Leszczuk y Flaherty, 2000). Con respecto al comportamiento en tareas de CSNc, las lesiones de amígdala atenúan (núcleo lateral) o eliminan (núcleo medial) la respuesta inicial ante la devaluación del incentivo (Becker, Jarvis, Wagner, y Flaherty, 1984), mientras que ratas con lesiones en la corteza cingulada anterior muestran un enlentecimiento notable de la recuperación del CSNc (Ortega, Uhelski, Fuchs, y Papini, 2011). Por otro lado, otros estudios han mostrado que lesiones en algunas áreas asociadas con el sistema gustativo deterioran el efecto de CSNc, sin afectar la habilidad de las ratas a responder diferencialmente ante las diferentes concentraciones de sacarosa diluida. Estas áreas incluyen el núcleo parabraquial (Grigson, Spector, y Norgren, 1994), el tálamo gustativo (Reilly y Trifunovic, 1999; Sastre y Reilly, 2006) y la corteza insular (Lin, Roman, y Reilly, 2009). Finalmente, algunos autores han hallado que tras el primer ensayo de postcambio de un CSNc se produce una gran activación (medida a través de c-fos) de zonas corticales y subcorticales, mientras que dicho patrón de expresión no se detecta después del segundo ensayo de postcambio (Pecoraro y Dallman, 2005). Los autores incluso llegan a proponer que la respuesta emocional del primer día de postcambio sería tan fuerte, que sería ese el verdadero motivo por el cual ciertos fármacos ansiolíticos no tendrían efectos atenuantes en la respuesta.

En definitiva, la gran variedad de evidencia conductual, neuroendocrina, farmacológica y neuroanatómica encontrada en torno a la existencia de un proceso emocional de naturaleza negativa, similar al que aparece en otro tipo de situaciones en las que se presenta un estímulo doloroso o novedoso, permite conceptualizar las situaciones comentadas como modelos animales susceptibles de ser utilizados para explorar las bases psicobiológicas de la ansiedad.

*Al fin y al cabo, somos lo que hacemos
para cambiar lo que somos"*

Eduardo Galeano, 1940.

D. LÍNEAS DE RATAS ENDOCRIADAS EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DE LA FRUSTRACIÓN.

No todos somos igual de vulnerables a padecer trastornos o desequilibrios emocionales. Un mismo evento puede tener significados e implicaciones muy distintas para según qué personas. No obstante, la experiencia, el aprendizaje y la plasticidad sináptica que de él se deriva pueden ayudarnos a cambiar lo que genéticamente nos viene dado.

La utilización de líneas de ratas psicogenéticamente seleccionadas en función de su reactividad emocional supone una herramienta muy útil dirigida al estudio de la interacción genética-ambiente, así como a demostrar la implicación de procesos emocionales de naturaleza negativa en situaciones de pérdida. En este sentido, la conceptualización de las emociones de pérdida como estados comparables al miedo y la ansiedad también ha sido puesta de manifiesto a través del empleo de animales endocriados por cruzamiento selectivo, en la literatura también llamadas líneas consanguíneas o endogámicas. Los animales endocriados por cruzamiento selectivo posibilitan el estudio de cepas de roedores que expresan conductas extremas en una dimensión temperamental dada, y también aportan una evidencia de que la conducta en cuestión se encuentra en alguna medida determinada genéticamente. En el caso que nos ocupa, nos brinda la posibilidad de indagar sobre la implicación de componentes emocionales en paradigmas experimentales relacionados con pérdida de

recompensa, al comparar animales psicogenéticamente seleccionados en función de su reactividad emocional. Aunque en la literatura existen pocos estudios de este tipo, se pueden destacar los que se citan a continuación (véase Anexo II: Cuenya et al., 2011).

En primer lugar, Flaherty y Rowan (1989) compararon la ejecución de las ratas Syracuse de Alta Evitación (Syracuse High Avoidance, SHA) y Syracuse de Baja Evitación (Syracuse Low Avoidance, SLA) en la prueba de CSNc. Estas cepas fueron seleccionadas por su aprendizaje de evitación activa, y si bien no difieren en sus niveles de actividad locomotora, capacidad sensorial o habilidad de aprendizaje general, muestran diferencias en su reactividad emocional, evidenciando mayores niveles de ansiedad las ratas SLA (e.g. mayor defecación en el campo abierto y tigmotaxis; Brush et al., 1985). Comparando ambas cepas en una prueba de CSNc, los autores hallaron que las ratas SLA mostraban un contraste de mayor magnitud, y que el fármaco ansiolítico clordiazepóxido atenuaba el mismo, mientras que las ratas SHA mostraban un contraste menor y no eran sensibles al clordiazepóxido.

En segundo lugar, Rowan y Flaherty (1991) compararon a las líneas de ratas Maudsley Reactivas (MR) y Maudsley No Reactivas (MNR) en este mismo paradigma consumatorio. Estas líneas fueron seleccionadas por Broadhurst (1975) en función de su respuesta en la prueba del campo abierto (Hall, 1934), sobre la base de su baja (MNR) o alta frecuencia (MR) de defecación en dicha prueba. Contrario a lo esperado, los autores hallaron que las MR presentaron un contraste menos intenso que las MNR, un resultado que podría deberse a la inconsistencia conductual que muestran estos animales cuando son expuestos a otras pruebas de

ansiedad, como el laberinto elevado o la tarea de evitación activa en dos sentidos (Broadhurst, 1975; Overstreet, Rezvani, y Janowsky, 1992).

Otra cepa con la que se han estudiado los efectos de la devaluación de la recompensa en una tarea consumatoria es la Okamoto (SHR), compuesta por las ratas espontáneamente hipertensas, en relación con sus controles genéticamente similares pero normotensas (Wistar-Kyoto, WKY). Trabajos previos con esta cepa mostraron que las ratas SHR no sólo presentan un peor rendimiento en tareas de aprendizaje y memoria, sino también una mayor actividad locomotora. Con respecto a los niveles de ansiedad característicos de estas cepas, los resultados son contradictorios y parecen depender de los procedimientos y medidas utilizados, existiendo trabajos que sugieren una mayor emocionalidad en las SHR, mientras que en otros estudios las SHR muestran menores indicadores de miedo (véase Bentosela y Mustaca, 2005). En un estudio de CSNc (Bentosela y Mustaca, 2005), se halló que las SHR no mostraron déficit en el aprendizaje y la memoria en el CSNc, ya que presentaron una adquisición similar a las WKY durante las sesiones de precambio. Sin embargo, las ratas SHR respondieron más intensamente ante la devaluación inesperada del reforzador y mostraron un efecto de contraste más duradero que las WKY.

Finalmente, Eysenck y Broadhurst (1964) compararon a las cepas MR (mayor reactividad emocional) y las MNR (menor reactividad emocional) en una prueba de CSNi efectuada en un laberinto recto, hallando que tanto las MR como las MNR mostraban efecto de contraste, si bien en las MR dicho efecto fue de mayor intensidad.

Estos hallazgos experimentales parecen poner en evidencia que el rasgo temperamental de reactividad emocional constituye un perfil

conductual que integra las respuestas inducidas por frustración, además de aquéllas activadas por novedad y castigo, lo supone un apoyo a las teorías defensoras de las similitudes existentes entre estos estados emocionales (Gray y McNaughton, 2000).

Recientemente se ha desarrollado una línea de investigación en el Laboratorio de Psicología Animal de la Universidad de Jaén dirigida a analizar la conducta inducida por experiencias de pérdida en dos cepas de animales que, como en los estudios previamente comentados, han sido seleccionadas en función de sus diferencias extremas en reactividad emocional: las ratas Romanas consanguíneas de Alta (RHA-I) y Baja Evitación (RLA-I). Dada la relevancia que tiene esta línea para la presente Tesis Doctoral los resultados más relevantes obtenidos en la misma se exponen a continuación.

Las ratas Romanas no consanguíneas de Alta (RHA-Verh) y Baja Evitación (RLA-Verh) fueron seleccionadas en 1972 por su alta (RHA-Verh) o baja (RLA-Verh) capacidad para adquirir la tarea de evitación activa en dos sentidos (Driscoll y Bättig, 1982). Desde 1993 se ha continuado con la reproducción y mantenimiento de estas cepas en la Universidad Autónoma de Barcelona, dando lugar a la variedad consanguínea denominada RHA-I y RLA-I. Son numerosas las evidencias experimentales que demuestran que, como consecuencia de esta selección psicogenética, estas cepas de animales difieren en su reactividad emocional. Así, las ratas RLA (tanto consanguíneas como no consanguíneas) muestran una respuesta de ansiedad más marcada cuando son expuestas a una amplia variedad de pruebas relacionadas con conflicto, novedad y exposición a estímulos que provocan miedo innato. Dado que los estudios experimentales que componen esta Tesis Doctoral fueron realizados usando animales

pertenecientes a la colonia consanguínea nos centraremos principalmente en los datos obtenidos con la misma.

Así, se ha observado en las ratas RLA-I una supresión comportamental en el test de conflicto de Vogel que no aparece en ratas RHA-I (Ferré et al., 1995). Una mayor inhibición conductual en la cepa RLA-I también se observa cuando los animales son expuestos a tareas relacionadas con novedad y exploración, como el campo abierto (Fernández-Teruel et al., 1992), la tabla de agujeros (Fernández-Teruel et al., 1997), o el test de luz/oscuridad (Thierry y Peter, 2003). De la misma manera, las ratas RLA-I y RHA-I también muestran un patrón comportamental diferente cuando son expuestas a estímulos de miedo incondicionado (López-Aumatell et al., 2009) o condicionado (Aguilar et al., 2003), mostrando las primeras más respuestas de inmovilización (*freezing*) que las segundas. No obstante, existen resultados contradictorios cuando se emplean otros tests de ansiedad, como el laberinto elevado, el test de movilidad o el laberinto sucesivo, dado que en dichas pruebas no siempre se observa la esperable tendencia a explorar más espacios abiertos en la cepa RHA-I en relación con la RLA-I (Escorihuela et al., 1999; datos no publicados).

Además de estas diferencias comportamentales, se han observado diferencias neuroendocrinas que indican que las ratas RLA muestran una mayor reactividad hormonal y fisiológica que las ratas RHA, tanto en condiciones de reposo como en respuesta a situaciones amenazantes (Carrasco et al., 2008; Steimer y Driscoll, 2005; Thierry y Peter, 2003). En concreto, las ratas RLA-Verh manifiestan una mayor respuesta de estrés (por ejemplo, mayores niveles hormonales de ACTH, corticosterona y prolactina) y adoptan un estilo de afrontamiento más pasivo cuando se

enfrentan a nuevas situaciones ambientales (Steimer y Driscoll, 2005; Thierry y Peter, 2003). Por el contrario, las ratas RHA-Verh muestran menores índices de ansiedad ante situaciones novedosas, así como una mayor tendencia a la búsqueda de sensaciones y la impulsividad (Fattore, Fadda, y Fratta, 2009; Steimer y Driscoll, 2005; Thierry y Peter, 2003). Resultados similares se encuentran en las cepas consanguíneas, habiéndose hallado una mayor respuesta hormonal del eje HHA en la cepa RLA-I, acompañado de un estilo de afrontamiento más pasivo (Díaz-Morán et al., 2012). En esta línea, estudios recientes han encontrado que cuando estas cepas son expuestas a tareas como la polidipsia inducida por programa, la tarea de descuento por demora y la tarea de tiempo de reacción serial con 5-elecciones, la cepa RHA-I muestra mayores índices de impulsividad que la RLA-I, ingiriendo una mayor cantidad de agua, eligiendo un menor número de veces la recompensa demorada y mostrando un pobre control inhibitorio (Moreno et al., 2010). En esta misma línea, otro de los estudios que apoya la naturaleza más impulsiva de las ratas RHA fue realizado por Coppens y cols., esta vez con ratas Romanas no consanguíneas. Los autores encontraron mayores índices de comportamiento impulsivo mediante el uso de un paradigma de condicionamiento operante en el que la presentación del refuerzo era impredecible (programa de reforzamiento de intervalo variable 15) (Coppens et al., 2013).

Por otra parte, se han observado en estas cepas diferencias neuroanatómicas y funcionales en estructuras cerebrales relacionadas con emoción y motivación, como la amígdala, el hipocampo, el núcleo accumbens y la corteza prefrontal, entre otras (Driscoll et al., 2009; Gómez, Morón et al., 2009). En este sentido, se han hallado diferencias

electrofisiológicas, neuroquímicas y neuroanatómicas en la amígdala central que parecen estar relacionadas con la mayor reactividad emocional que muestran las ratas RLA frente a las RHA en situaciones de estrés inducido por inmovilización, durante la exposición a un contexto asociado previamente con una descarga eléctrica o en la respuesta de sobresalto potenciada por miedo (Driscoll et al., 2009; Henke, 1973; Roozendaal, Wiersma, Driscoll, Koolhaas, y Bohus, 1992). Nuestro grupo de investigación ha hallado también diferencias en densidad celular en la amígdala basolateral entre las ratas Romanas, siendo ésta mayor en la cepa RLA-I en comparación con la RHA-I (Gómez, Morón et al., 2009). Además, las diferencias que estas cepas presentan en la ejecución de la tarea de evitación de un solo sentido bajo la condición de 1 segundo en el compartimento de seguridad desaparecen cuando se realizan lesiones electrolíticas de la amígdala central (Morón et al., 2010).

Estas diferencias neuroanatómicas se acompañan de diferencias neuroquímicas que afectan a sistemas de neurotransmisión como el de la dopamina, la serotonina (5-HT), el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y los neuropéptidos, entre otros (D'Angio et al., 1988; Giorgi et al., 2003; Giorgi, Piras, Lecca, y Corda, 2005; Giorgi et al., 2005; Guitart-Masip et al., 2006; Guitart-Masip et al., 2008; Lecca et al., 2004). D'Angio et al. (1988), por ejemplo, realizaron un estudio en el que encontraron diferencias dopaminérgicas entre estas cepas que podrían explicar las variaciones en emocionalidad de las mismas. En esta ocasión expusieron a las ratas Romanas a distintas situaciones ambientales estresantes (exposición a un ambiente novedoso, sonido fuerte, pellizco en la cola e inmovilización) y encontraron que la exposición de ambas líneas de ratas a dichas situaciones produjo un aumento de los niveles extracelulares de dopamina

en el corteza prefrontal de las ratas RHA que no apareció en las RLA (D'Angio et al., 1988). Más tarde, este estudio fue replicado y ampliado (Giorgi et al., 2003), y en él se pudo observar un aumento en los niveles de dopamina en la corteza prefrontal medial de las ratas RHA que no apareció en las RLA en respuesta a la presentación de distintos estímulos aversivos. Al parecer, estas diferencias entre cepas en los niveles del neurotransmisor podrían estar asociadas con un estilo de afrontamiento más activo en las ratas RHA, así como con una baja frecuencia de inmovilización y acicalamiento en las mismas (Giorgi et al., 2003). Por el contrario, las ratas RLA muestran una mayor liberación de dopamina en el núcleo accumbens que las ratas RHA bajo condiciones de estrés (Giorgi et al., 2003). Asimismo, las ratas RHA muestran una mayor respuesta conductual a la apomorfina (Durcan, Wraight, y Fulker, 1984; Giménez-Llort et al., 2005) y a la anfetamina (Driscoll, 1986), agonistas dopaminérgicos directo e indirecto, respectivamente (Cañete et al., 2003). Paralelamente, esta cepa muestra una mayor respuesta conductual y una mayor liberación de dopamina en el núcleo accumbens en respuesta a la administración de la anfetamina, cocaína, morfina y etanol (Corda et al., 2001; Giorgi et al., 1997; Lecca et al., 2004). Estos resultados podrían explicar el fenómeno de sensibilización comportamental que juega un importante papel en el *craving*, la búsqueda compulsiva de la droga y la vulnerabilidad a la recaída (Giorgi et al., 2007). La respuesta dopaminérgica inducida por estas drogas está más acentuada en el núcleo accumbens *shell* en comparación con la división *core* en la cepa RHA, mientras que no se hallan diferencias entre las subregiones del núcleo accumbens en la cepa RLA (Corda et al., 1997; Lecca et al., 2004). Es ampliamente aceptado que la liberación de dopamina en el núcleo accumbens constituye el sustrato neuronal común responsable del efecto reforzante de todas las drogas de abuso (Di Chiara y Imperato,

1988; Imperato y Di Chiara, 1986), estando también implicada en las diferencias individuales en las conductas de búsqueda/preferencia por novedad (Bardo, Donohew, y Harrington, 1996). Por consiguiente, esta mayor capacidad de respuesta del sistema dopaminérgico mesoaccumbal en las ratas RHA podría ser la base de su perfil comportamental característico y diferenciado de la cepa RLA.

Por otro lado, se han realizado estudios dirigidos a comparar la actividad de este neurotransmisor (dopamina) con la del GABA. Los resultados encontrados indican, por un lado, la existencia de un menor efecto de la acción del GABA sobre el canal de cloro (Cl⁻) en la corteza cerebral de las ratas RLA en comparación con las RHA y, por otro lado, una menor densidad de receptores D1 en el núcleo accumbens de las ratas RLA frente a las RHA (Giorgi et al., 1994). En este mismo sentido, estudios realizados posteriormente han hallado un mayor número de receptores D1 y D3 en el núcleo accumbens *shell* de las ratas RHA-I frente a las RLA-I, si bien no se han encontrado diferencias entre cepas en el receptor D2 en dicha región (Guitart-Masip et al., 2006). Estos hallazgos podrían explicar las diferencias entre cepas en emocionalidad y sensibilidad a la acción de distintas drogas psicoactivas (Giorgi et al., 1994; Guitart-Masip et al., 2006).

Del mismo modo, estudios llevados a cabo en el hipocampo sugieren que las ratas RLA/Verh poseen una mayor actividad colinérgica en comparación con las ratas RHA/Verh. Estas diferencias en actividad colinérgica hipocámpal no parecen deberse a diferencias de cepa en el número de receptores muscarínicos, sino a una severa deficiencia de fosfolipasa C- β observada en las ratas RHA/Verh en comparación con las RLA/Verh, relacionada a su vez con una menor expresión de esta enzima (Sallés et al., 2001). Estas divergencias podrían explicar, entre otras, las

diferencias observadas entre estas cepas en tareas relacionadas con memoria de trabajo y aprendizaje asociativo, como el condicionamiento clásico de miedo (Escorihuela et al., 1997), la respuesta de sobresalto potenciado por miedo (López-Aumatell et al., 2009), la aversión condicionada al sabor (Martin y Bättig, 1980), la prueba de emparejamiento a un lugar llevada a cabo en la piscina de Morris (Aguilar et al., 2002), o el aprendizaje en un laberinto hexagonal (Fernández-Teruel, Escorihuela, Driscoll, Tobeña, y Bättig, 1994).

Una propuesta bastante conocida es aquella que aboga por la implicación del neurotransmisor 5-HT en el control de la respuesta ante estímulos estresantes y en la aparición de trastornos de ansiedad. De hecho, existen muchos fármacos que son capaces de mejorar la transmisión serotoninérgica y reducir la ansiedad, como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina. Mediante la técnica de microdiálisis cerebral se ha podido observar, por ejemplo, que la administración sistémica y local de clorimipramina y fluoxetina (antidepresivo tricíclico e inhibidor selectivo de la recaptación de 5-HT, respectivamente) produce un mayor aumento de 5-HT en la corteza frontoparietal de las ratas RHA en comparación con las RLA. Igualmente, en las principales regiones cerebrales inervadas por el rafe, como el hipocampo y la corteza frontoparietal, se ha encontrado un mayor número de transportadores serotoninérgicos en las ratas RHA frente a las RLA. Más aún, Piras et al. (2010) evaluaron la ejecución comportamental de ratas Romanas no consanguíneas en la prueba de natación forzada. Estos autores realizaron medidas tanto basales como tras la administración de antidepresivos como la desipramina, fluoxetina y clormipramina. Los resultados mostraron que, sin tratamiento farmacológico, las ratas RLA realizaron mayor número de inmobilizaciones

y menos de escalada que las ratas RHA. Sin embargo, la administración de estos antidepresivos en dicha cepa redujo la conducta de inmovilización y aumentó la de lucha/escape y nado. En la cepa RHA, por el contrario, ninguno de estos fármacos afectó a los comportamientos registrados en la prueba conductual. Estos hallazgos ponen de manifiesto la posibilidad de emplear estas cepas para investigar el papel que juega la serotonina en la aparición de trastornos de ansiedad y depresión (Giorgi et al., 2003; Piras et al., 2010).

Por otro lado, se han realizado estudios en los que aparecen diferencias de cepa en neuropéptidos que podrían estar asociadas con la mayor preferencia por ciertas drogas de abuso que muestran las ratas RHA frente a las RLA. Así, por medio de la técnica de hibridación *in situ*, se han encontrado, por un lado, elevados niveles de dinorfinas en el núcleo accumbens *shell* y, por otro, mayores niveles de encefalinas en la corteza cingulada de las ratas RHA-I frente a las RLA-I. Sin embargo, estas últimas mostraron altos niveles en la expresión génica de encefalinas en áreas restringidas del núcleo estriado dorsal. Estas divergencias en la expresión génica de diferentes neuropéptidos podrían estar relacionadas con las diferencias en la preferencia por el consumo de alcohol que muestran estas cepas (Guitart-Masip et al., 2006; Manzo et al., 2012). En una línea similar, Guitart-Masip y cols., (Guitart-Masip et al., 2008) observaron que la exposición de las ratas Romanas consanguíneas a un programa de administración repetida de anfetamina seguido por una prueba (*challenge*) de administración de la sustancia tuvo efectos locomotores diferentes entre las ratas RHA-I y RLA-I, los cuales se acompañaron de diferencias de cepa: (a) en la expresión del gen de acción inmediata NGFI-A (*zif268*) en el estriado rostral dorsomedial y ventral (en RHA-I) y en la amígdala central

(en RLA-I); (b) en los niveles de expresión de proencefalina y prodinorfina en la subdivisión medial del estriado rostral, y (c) en la expresión de los marcadores de actividad sináptica secretogranina y PSD-95 en la división *core* del núcleo accumbens (este último relacionado con la neurotransmisión glutamatérgica mediada por receptores AMPA). En opinión de los autores, estas diferencias funcionales podrían ser la base de la vulnerabilidad diferencial de las ratas Romanas a desarrollar sensibilización conductual tras la administración repetida de psicoestimulantes (Guitart-Masip, Johansson, Fernández-Teruel, Tobeña, y Giménez-Llort, 2008).

Finalmente, un gran reto en el campo de la Neurociencia es el de descifrar la compleja relación entre fenotipo y genotipo. En este contexto, el desarrollo de nuevas técnicas genéticas y de análisis multivariado está posibilitando el estudio de las bases genéticas de la ansiedad. En la actualidad es posible estudiar si un lugar genético concreto localizado en un cromosoma (*quantitative trait loci*, QTL) puede contribuir a la variación conductual que se observa en las diferentes pruebas experimentales de miedo/ansiedad que se utilizan con estas cepas. En este contexto, algunos investigadores han encontrado en las ratas Romanas un locus en el cromosoma 5 que está asociado con el aumento de la conducta de inmovilización (*freezing*) en condicionamiento clásico de miedo, y con la disminución de la respuesta de evitación y de la respuesta interensayo en el aprendizaje de evitación activa en dos sentidos (Fernández-Teruel, Escorihuela et al., 2002).

En definitiva, el empleo de las ratas Romanas en el estudio científico de la ansiedad y la vulnerabilidad al abuso de drogas ha generado una ingente cantidad de trabajos de muy diversa índole, los cuales han

permitido caracterizar a las ratas Romanas en función de sus diferencias comportamentales, neuroendocrinas/neuroquímicas, neuroanatómicas y genéticas.

Recientemente en nuestro laboratorio se han llevado a cabo distintos estudios que indican que estas cepas difieren en su reactividad conductual ante la reducción u omisión súbita en la magnitud de una recompensa esperada. En primer lugar, se ha comprobado que las ratas Romanas hembra RHA-I y RLA-I reaccionan de forma diferente cuando son expuestas a una tarea de evitación en un sólo sentido en la que se induce un efecto de CSN al reducir inesperadamente el tiempo de permanencia en el compartimento de seguridad (asociado con la ausencia de descarga eléctrica), ya que sólo la cepa RLA-I mostró un efecto de CSN que se manifestó mediante el deterioro transitorio en la ejecución de la respuesta de evitación (Torres et al., 2005).

Estos animales también muestran diferencias conductuales cuando son expuestos a una tarea de aprendizaje instrumental apetitivo en la que el efecto de CSN se induce mediante la reducción en la magnitud del reforzador apetitivo esperado (de 12 *pellets* a 2 *pellets*), presentado en el compartimento meta de un laberinto recto. Esta reducción provocó la aparición de un efecto de CSN en la cepa RLA-I que no se observó en la cepa RHA-I (Rosas et al., 2007).

Por otro lado, se ha comprobado que las diferencias que aparecen entre estas cepas en situaciones de contraste también aparecen tras la omisión completa del reforzador, es decir, en condiciones de extinción. En este sentido, las ratas RHA-I muestran una mayor resistencia a la extinción de una respuesta instrumental apetitiva que las RLA-I, un resultado que, de

nuevo, podría explicarse por la aparición de respuestas de frustración más marcadas en esta última, las cuales serían incompatibles con la ejecución de la respuesta previamente aprendida durante la fase de adquisición (Gómez, de la Torre et al., 2009). No obstante, las diferencias de cepa en la tasa de extinción se anulan cuando se utiliza un programa de reforzamiento parcial durante la fase de adquisición, observándose un aumento en la resistencia a la extinción (ERPE) sólo en la cepa RLA-I (Gómez et al., 2008).

Finalmente, las diferencias de cepa descritas en tareas instrumentales también se hacen evidentes en tareas consumatorias, mostrando la cepa RLA-I una tasa de recuperación del CSNc más lenta en comparación con la RHA-I cuando se utilizan concentraciones de sacarosa del 22% en la fase de precambio y del 4% en la de postcambio (Gómez, Escarabajal et al., 2009).

En conclusión, los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación con ratas Romanas han permitido ampliar la caracterización neuroconductual de estas cepas, al extender a situaciones de pérdida de recompensa las tareas experimentales en las que estos animales muestran un perfil comportamental diferente. Asimismo, estos hallazgos constituyen un apoyo para aquellos modelos teóricos que defienden la naturaleza emocional de estos fenómenos comportamentales. Finalmente, estos trabajos podrían ser de enorme utilidad para explorar de qué modo las diferencias biológicas (determinadas genéticamente) podrían interactuar con experiencias ambientales para modular la vulnerabilidad de los individuos a desarrollar y/o superar trastornos emocionales inducidos por sucesos vitales relacionados con pérdida de recompensa. No obstante, resulta necesario seguir evaluando la idoneidad de estas afirmaciones mediante la realización de estudios conductuales adicionales. Al mismo

tiempo, incluir análisis genéticos en los estudios de conducta como los que se presentan en esta Tesis Doctoral abre puertas a una investigación de carácter multidisciplinar que permitirá analizar estos rasgos comportamentales complejos desde un enfoque molecular.

“La sutileza humana...nunca podrá crear nada tan bello, tan simple o tan directo como lo creado por la naturaleza”

Leonardo da Vinci, 1452-1519.

5. TÉCNICA DE *MICROARRAY* EN EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL

Resulta cuanto menos curioso que la genética, con tan sólo cinco letras, haya creado el lenguaje más complejo que existe. La vida, a lo largo de sus millones de años de evolución, ha dado lugar y sigue desarrollando una “obra” que sólo recientemente hemos comenzado a comprender en profundidad a través de los avances producidos en la Biología de la herencia.

Desde que a comienzos del siglo XXI se publicaran los primeros borradores de la secuencia genómica humana (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001), la genética como área científica de conocimiento ha experimentado un crecimiento exponencial que ha permitido, entre otros muchos hallazgos, dar a conocer los 3.200 millones de pares de bases que forman nuestro genoma nuclear. La finalización del proyecto Genoma Humano ha supuesto, además, un cambio global de mentalidad en el mundo científico, ya que ha cambiado la forma de definir, diagnosticar y tratar muchas enfermedades humanas. Este hecho se ha visto favorecido por el desarrollo de nuevas tecnologías para el estudio de los procesos biológicos (Martínez-Conejero y Horcajadas, 2008).

Tras el conocimiento del Genoma Humano, uno de los objetivos más importantes fue la identificación y localización de genes con expresión y funciones reguladoras de los mecanismos moleculares del

comportamiento, de la emoción y de los procesos cognitivos en diferentes especies (Mei et al., 2005; Wang et al., 2003). En este sentido, la complejidad que supone la investigación de la susceptibilidad genética humana a sufrir trastornos mentales sugiere que los rasgos psicológicos podrían estar determinados por el efecto conjunto de genes con implicaciones principales (“major genes”), y de multitud de genes con influencias secundarios. Sin embargo, debido a la heterogeneidad de las respuestas/rasgos de ansiedad y miedo en diferentes cepas de ratas, un mismo comportamiento puede implicar, o estar asociado, con diferentes rutas génicas. Un ejemplo de ello podemos encontrarlo en el estudio realizado por Fernández-Teruel y colaboradores (Fernández-Teruel, Escorihuela et al., 2002) en el que, como se comentó en páginas anteriores, los autores observaron que los QTL identificados e implicados en el comportamiento de adquisición de la tarea de evitación activa en dos sentidos no fueron correspondidos con los resultados de otros estudios que se sirvieron de otra técnica genética (la de *microarray*) para realizar el análisis de datos (Zhang et al., 2005).

Si bien estas metodologías son relativamente recientes y los resultados que se derivan de las mismas no siempre conducen a los mismos resultados, los estudios genéticos basados en la tecnología del mapeo fino (de alta resolución) de QTL en rata y ratón claramente indican la implicación de multitud de genes con funciones o influencia sobre los procesos psicológicos normales y los trastornos mentales (Flint y Shifman, 2008). Es asimismo relevante destacar que el mapeo fino de QTL en ratones ya ha permitido la identificación de algún gen, como el RGS2 (“regulator of G-proteinsignaling 2, 24kDa”), validado del mismo modo en estudios con humanos, como un gen cuantitativo con influencia sobre la

ansiedad e introversión (ver Fullerton et al., 2008; Smoller et al., 2008; Yalcin et al., 2004; Willis-Owen y Flint, 2007).

Dado que para realización de esta Tesis Doctoral se recurrió a la técnica de *microarray* como herramienta de análisis genético de las muestras biológicas derivadas de las ratas Romanas (en condiciones basales y tras experiencias de frustración), consideramos oportuno dedicar unas líneas a su explicación detallada.

La técnica genética de “*microarray*” tuvo su origen a finales del siglo XX, abriendo nuevas posibilidades en la investigación de los procesos moleculares que subyacen al procesamiento y almacenamiento de información en el cerebro (e.g, Dopazo, 2006; Irwin, 2001). La tecnología de *microarray* destaca como una herramienta única y potente para la caracterización global de nuevas rutas y mecanismos moleculares que subyacen al comportamiento. Este tipo de estudios tienen como principal objetivo medir el estado de los niveles de todos los genes transcritos activamente, con la premisa implícita de que los rasgos observables del comportamiento (fenotipo), están frecuentemente asociados con patrones reconocibles de expresión genética (genotipo) que reflejan adaptaciones estructurales, funcionales y metabólicas en regiones cerebrales relevantes (Robinson y Ben-Shahar, 2002; Whitfield, Cziko, y Robinson, 2003).

El desarrollo de la técnica de *microarray* supuso un cambio cualitativo para los estudios genéticos, ya que permite un escaneado general de la totalidad del genoma, guiando de este modo el análisis de genes concretos que pudieran resultar de interés en cada caso. Un *microarray* es una colección de microscópicos puntos o *spots* donde hay depositadas miles de sondas de ADN o anticuerpos adheridos al soporte de

vidrio u otro tipo de soporte membranoso, que reconocen secuencias complementarias de ARN mensajero (ARNm), ADN complementario (ADNc) o antígenos proteicos, según el tipo de *microarray*. Al principio estos estudios se hacían en grandes membranas en las que apenas cabían unas cuantas decenas de sondas diferentes para detectar algunos genes concretos. En menos de 10 años se ha conseguido miniaturizar hasta conseguir poder estudiar todos los genes conocidos (e incluso secuencias no codificantes) en simples portaobjetos de cristal de unos 6 x 1,5 cm. La principal característica de esta técnica es que realiza miles de mediciones en un sólo experimento (Martínez-Conejero y Horcajadas, 2008).

Actualmente se emplean diferentes tipos de análisis de *microarray* en función del objetivo del estudio genético. Algunos de ellos son los análisis de *microarray* de ADN, los de hibridación genómica comparada y los análisis de *microarray* de expresión (Martínez-Conejero y Horcajadas, 2008; Spisak, Tulassay, Molnar, y Guttman, 2007). Estos últimos permiten el análisis de los patrones de expresión mediante la comparación de la cantidad de ARNm.

Los *microarrays* más comunes son los de expresión génica, aunque todos ellos siguen unos protocolos muy parecidos. Para realizar un estudio con estos *microarrays*, deben ser incubados con ARNm o ADNc marcado procedente de las muestras problema que queremos analizar. El marcaje se lleva a cabo con nucleótidos a los que se les unen moléculas que emiten fluorescencia (marcadores de cianina Cy3 y Cy5), o con biotina, dependiendo del sistema elegido. Una vez hibridados se eliminan, mediante lavados, todas las cadenas que no se han unido, permaneciendo unidas aquellas que habían hibridado de forma específica, las cuales se hacen visibles tras entrar en contacto con las sondas genómicas que constituyen

el *microarray*. La lectura de las intensidades de las sondas hibridadas en cada spot se realiza mediante un escáner óptico de alta resolución (Figura 5). A partir de este procedimiento, se obtiene un nivel de expresión para cada gen, es decir, un grado diferente de fluorescencia. En los niveles cuantificados de ARNm, presentes en los tejidos, se pueden obtener los niveles de expresión de un gen determinado, de forma que una función celular alterada será la consecuencia de una alteración en el perfil de expresión génica celular (e.g. Rentarúa-Alcántara, 2007). Este tipo de análisis de *microarray* se aplica en genómica funcional, empleándose en la identificación de mecanismos fisiopatológicos o de genes implicados en el origen de diferentes enfermedades, en la comparación de la expresión génica de tejidos concretos procedentes de diferentes individuos, y en la obtención de multitud de valores de expresión genética para diferentes condiciones biológicas.

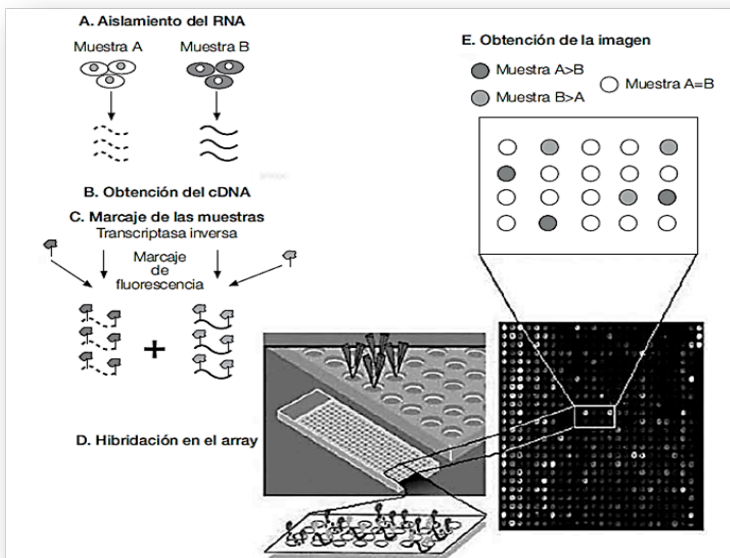


Figura 5: Esquema del proceso de análisis de muestras con *microarray* desde la extracción de ARNm, marcaje, hibridación y obtención de resultados (Martínez-Conejero y Horcajadas, 2008).

Existen algunos *microarrays* utilizados para estudiar el número de copias de cada segmento de un cromosoma, a modo de cariotipo, pero a un nivel mucho más fino y preciso (*microarrays* CGH, *Comparative Genome Hybridization*), lo cual permite determinar la existencia de duplicaciones, deleciones, etc. Otros, por el contrario, son útiles para estudiar mutaciones en un sólo nucleótido que producen enfermedades monogénicas (*microarrays* SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*). También se emplean para estudiar diferencias de procesamiento de los mensajeros (*microarrays* de *splicing*) o la expresión de los microRNAs (miRNA), con lo que se puede explorar su papel en la regulación de los mensajeros (*microarrays* de miRNA). Ciertos *microarrays* detectan diferencias en los patrones de metilación del DNA que alteran la expresión génica (*microarrays* de metilación), así como interacciones entre proteínas y secuencias específicas del ADN (*microarrays*ChIP-onchip). Por último, existen en el mercado *microarrays* capaces de detectar un número considerable de proteínas diferentes (*microarrays* de proteínas). La Figura 6 resume los tipos de *microarrays* existentes en la actualidad, así como el tipo de moléculas que estudia cada uno de ellos (Martínez-Conejero y Horcajadas, 2008).

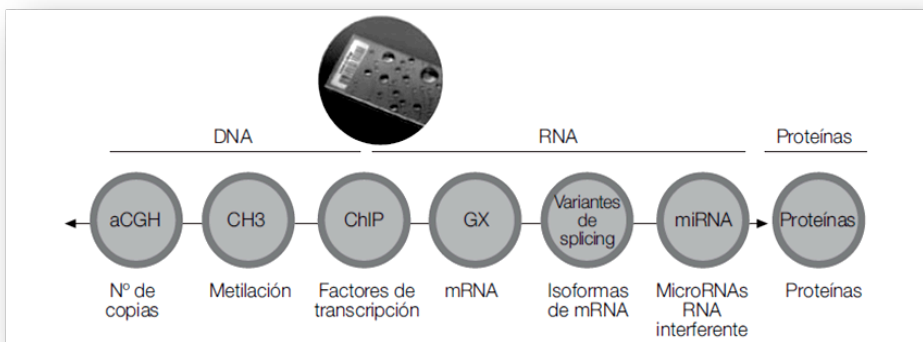


Figura 2: Tipos de microarrays y moléculas que estudian (Martínez-Conejero y cols., 2008).

La técnica de “*microarray* de expresión génica” ha sido la utilizada para el análisis de los estudios presentados en esta Tesis Doctoral. La principal razón por la que se usó la misma es por ser la técnica más aplicada en genómica funcional (Blohm y Guiseppi-Elie, 2001; Wang et al., 2003). Los primeros trabajos que se sirvieron de esta tecnología se centraron en la diferenciación de la expresión genética (análisis de “*clusters*” o métodos de agrupamiento) de conjuntos de genes que podían subyacer a cambios en alguna función macroscópica. Este tipo de análisis conlleva una reducción de la dimensionalidad de los resultados; o dicho de otro modo, permite extraer, de una enorme cantidad de datos, aquellos que tengan un comportamiento relacionado por sus niveles de expresión y por su posible implicación funcional. Posteriormente, la investigación empezó a dirigirse hacia el estudio de la expresión genética diferencial bajo diferentes condiciones experimentales (véase Dopazo, 2006). Así, este tipo de *microarray* permite la identificación de mecanismos fisiopatológicos a partir de la comparación de los patrones de expresión de miles de genes en paralelo, en varias muestras del mismo tipo de tejido, tanto a nivel basal como previamente sometidas a manipulaciones o condiciones experimentales diversas (Díaz-Morán et al., 2013; Irwin, 2001; Martínez-Conejero y Horcajadas, 2008; Morán et al., 2011). Es por ello que ha demostrado ser un instrumento eficiente para el análisis, en el caso que nos ocupa, de los mecanismos moleculares subyacentes a procesos psicológicos o rasgos complejos de comportamiento (e.g. Blohm y Guiseppi-Elie, 2001; Pan, Liu, Young, Zhang, y Wang, 2009; Ressler, Paschall, Zhou, y Davis, 2002; Wang et al., 2003). Estos rasgos se diferencian de las singularidades fenotípicas dependientes de un solo gen en que presentan manifestaciones fenotípicas con graduaciones distribuidas de manera continua (véase Tobeña y Fernández-Teruel, 2009, para revisión).

Fue durante los primeros años del siglo XXI cuando comenzaron a esclarecerse las funciones de genes relacionados con los mecanismos moleculares subyacentes a la ansiedad. Entre los descubrimientos más relevantes se encuentra la implicación en ansiedad de la proteína microtubular asociada (MAP), la de genes relacionados con neurotransmisores (GABA, noradrenalina y dopamina), así como vinculados a receptores de serotonina (5HT3), receptores de colecistoquinina y sistemas neuropeptídicos (Wang et al., 2003). Wang et al. (2003) realizaron un estudio en el que se inducían respuestas ansiosas de petrificación en ratas por exposición a olor de gato. Estos autores detectaron 54 genes con diferencias significativas en muestras de corteza cerebral entre las dos cepas de ratas estudiadas (16 genes expresados al alza y 38 expresados a la baja). Las ratas menos ansiosas, las Sprague-Dawley, presentaron sobre-expresión del gen asociado a la actividad reguladora de citoesqueleto y del factor trófico NGFI-A, así como sub-expresión del gen 5HT3R, en comparación con las ratas más ansiosas (las de la cepa PVG hooded). En esta misma línea, Harada y su equipo llevaron a cabo un experimento haciendo uso de un modelo animal de Trastorno por Estrés Postraumático que constó de dos fases: 2 horas de inmovilización y 20 minutos de natación forzada (Harada et al., 2008). En este estudio se identificaron 31 genes expresados diferencialmente (en hipocampo, amígdala y corteza cingulada anterior) en concordancia con los cambios observados en las ratas con síntomas de estrés postraumático, observándose niveles de expresión al alza del gen 5-HT_{2C} (5-hydroxytryptamine_{2C} receptor) y de la enzima ACE (angiotensin I-converting enzyme) en dichas ratas.

Por otra parte, Sirri et al. (2010) realizaron un experimento con ratones C57Bl/6N como sujetos, y encontraron algunos genes diferencialmente expresados en el hipocampo tras una tarea de condicionamiento clásico del miedo (*trace fear conditioning*). Algunos de los genes identificados coinciden con los hallados en estudios previos que utilizaron paradigmas experimentales diferentes (por ejemplo el gen *Dnajb4*), sugiriendo así la existencia de mecanismos comunes subyacentes a la consolidación de diferentes modalidades de aprendizaje aversivo. Además, estos autores realizaron análisis genéticos mediante la técnica de *microarray* tras 30 minutos, 2 y 6 horas después de finalizar la tarea comportamental, encontrando resultados diferentes en cada una de las condiciones. Así, en la condición de 30 minutos la mayoría de los genes expresados diferencialmente fueron factores de transcripción, y otros cuya función como reguladores de la respuesta de activación de la cascada de señalización de las MAPK es ampliamente conocida (Adams y Sweatt, 2002; Levenson et al., 2004). Tras 2 horas de la tarea de condicionamiento del miedo, muchos de los genes expresados tenían funciones en el control de calidad y plegamiento proteico, lo cual es coherente con la idea de que se requiere de la síntesis de nuevas proteínas para la consolidación de los recuerdos. Por su parte, la mayoría de los genes encontrados en la condición de 6 horas no habían sido descritos con anterioridad como necesarios para el proceso de formación de la memoria a largo plazo. No obstante, algunos de estos genes, como *Sfrs6* (splicing factor, arginine/serine-rich 6), *Ppm1m* (proteinphosphatase 1M), *Camk2d* (calcium/calmodulin-dependentproteinkinase II, delta) y *Sytl2* (synaptotagmin-like 2), pertenecen a familias de genes cuyos miembros han sido previamente descritos por otros autores como expresados diferencialmente después del condicionamiento del miedo (Mei et al.,

2005). Otro aspecto relevante que se puso de manifiesto bajo la condición de 6 horas fue que la mayoría de los genes expresados diferencialmente estuvieron regulados a la baja. Esto, tal y como los autores argumentan, pudo deberse al hecho de que muchos productos génicos tienen eventualmente que disminuir en su expresión para lograr una modificación sináptica estable que derive en la consolidación del aprendizaje (Sirri et al., 2010).

Otro de los estudios que buscan los sustratos genéticos del condicionamiento clásico del miedo a través del uso de la tecnología de *microarray*, es el estudio realizado por Mei et al. (2005), quienes hallaron 222 genes relacionados con el miedo condicionado que presentaban expresión diferencial en la amígdala (123 genes sobre-expresados y 99 sub-expresados). De ellos, el 22% presentó funciones relacionadas con adhesión celular y la estructura proteínica (por ejemplo α -actina, β -tubulina y proteínas microtubulares asociadas -MAP4-). Resulta interesante el hecho de que uno de dichos genes haya sido involucrado en la regulación de receptores ionotrópicos, como el receptor GABA_A (GABARAP), cuyo papel en la ansiedad es notorio. La regulación a la baja de este receptor en la amígdala, posterior a la inducción de miedo condicionado, sugirió, según los autores, que el efecto inhibitorio del GABA decrecería para permitir un incremento en la excitabilidad sináptica (Mei et al., 2005).

Otros genes que han sido hallados diferencialmente expresados tras experiencias de ansiedad condicionada son el Cx30 (astrocyte-specific connexin-30), relacionado con funciones gliales (Rash, Yasumura, Dudek, y Nagy, 2001) y el gen relacionado con el FCR1 (cromosoma X frágil) (Paradee et al., 1999). En concreto, ratones mutantes *knockout* para este

gen muestran un déficit significativo en la formación de la memoria relacionada con el miedo condicionado. Algo similar acaece con genes implicados en la formación de mielina, como MOBP (myelin-associated oligodendrocytic basic protein) (McCallion, Stewart, Montague, Griffiths, y Davies, 1999), PLP (proteolipid protein) (Yool et al., 2001) y OSP (oligodendrocyte-specific protein) (Bronstein, Popper, Micevych, y Farber, 1996). Por último, el gen activador del transcrito Egr-1 en rata mostró incrementos en sus niveles de expresión tras el condicionamiento de miedo, y la administración de diacepam provocó el bloqueo de este incremento y la reducción de la ansiedad (Letwin et al., 2006).

Con respecto a los paradigmas instrumentales aversivos para el estudio de la ansiedad, estos han demostrado también la implicación de algunos genes de gran relevancia. Una muestra de ello fue la comparación de la expresión génica hipocampal entre las cepas de ratas “Syracusa” de Alta y Baja Evitación (SHA y SLA, respectivamente), seleccionadas en función de su respuesta de evitación activa en dos sentidos, tarea cuya velocidad de adquisición se relaciona inversamente con los niveles de ansiedad. En este experimento se identificaron ocho genes relacionados con comportamientos de miedo y/o ansioso-depresivos con expresión diferencial en el hipocampo entre estas ratas: los genes Veli1, SLC3a1, Ptpro y Ykt6p, se hallaron regulados la baja en la cepa SLA, mientras que los genes SLC6A4, Aldh1a4 y CD74, estuvieron expresados al alza en dicha cepa con respecto a la SHA (Zhang et al., 2005). Entre estos cabe destacar el gen SLC6A4 (receptor transportador de la serotonina), por su implicación en la vulnerabilidad al estrés y la depresión, tanto en humanos como en animales. Asimismo, los genes Synapogyrin1 y Rab1b, también expresados diferencialmente a la baja en la cepa SLA (aunque no validados por qRT-

PCR) en el estudio de Zhang et al. (2005). También se han hallado en otros estudios regulados en la misma dirección en el hipocampo de ratas sometidas a un aprendizaje de evitación pasiva (D'Agata y Cavallaro, 2003) y a un paradigma de aprendizaje espacial (laberinto de Morris; Cavallaro, D'Agata, Manickam, Dufour, y Alkon, 2002; D'Agata y Cavallaro, 2003; Zhang et al., 2005). No obstante, estos resultados, así como las similitudes halladas entre los mismos, deben interpretarse con cautela, ya que se derivan de ratas no entrenadas y seleccionadas genéticamente, en un caso (Zhang et al., 2005) y de ratas entrenadas y no seleccionadas en los otros casos (Cavallaro et al., 2002; D'Agata y Cavallaro, 2003). Otra de las dificultades que puede presentarse a la hora de interpretar los resultados provenientes de los estudios de *microarray* es que existen algunos genes, como es el caso de *Veli1* (Zhang et al., 2005), que poseen dos isoformas homólogas en el hipocampo, y cada una de ellas tiene distribuciones diferentes (Misawa et al., 2001; Peng et al., 2003).

Existen también estudios que han comparado la cepa de ratas heterogéneas no consanguíneas (NIH-HS), derivadas del cruce de ocho cepas consanguíneas genéticamente alejadas entre sí (las MR/N, WN/N, WKY/N, M520/N, F344/N, ACI/N, BN/SsN y BUF/N) (Hansen y Spuhler, 1984), con las ratas Romanas, hallándose una mayor similitud entre las primeras y las RLA-I en rasgos como los de ansiedad y miedo, al mostrar ambas una peor ejecución en modelos de ansiedad condicionada e incondicionada con respecto a la cepa RHA-I (Díaz-Morán et al., 2013). Además, la cepa NIH-HS presenta un estilo de afrontamiento pasivo/reactivo y una respuesta hormonal ante el estrés mayor que la RHA-I (Díaz-Morán et al., 2012a). Díaz-Morán et al. (en prensa), realizaron un análisis de la expresión génica diferencial en muestras de amígdala e

hipocampo utilizando estas cepas de ratas como sujetos experimentales. Estos autores seleccionaron tres grupos de sujetos para su análisis genético, en función de sus respuestas en la tarea de evitación activa en dos sentidos (grupos de alto, medio y bajo nivel de ansiedad; Morán et al., 2011). Todos los animales habían sido evaluados en pruebas de ansiedad incondicionada, como el Laberinto Circular Elevado, miedo condicionado a un contexto, y ansiedad condicionada (tarea de evitación activa). Tres semanas después de la evaluación conductual, se diseccionaron las amígdalas e hipocampos, y tras la extracción de ARN, estas estructuras se analizaron mediante *microarray*. En el complejo amigdalino se encontraron 414 genes expresados diferencialmente en el grupo de ratas NIH-HS de “baja ansiedad” comparado con el de “alta ansiedad”, de los cuales 34 genes desempeñan funciones relevantes en relación con el sistema nervioso central (neurotransmisión, procesos inmunitarios, procesos hormonales, drogas de abuso y comportamiento). De este grupo de genes, 28 estaban expresados al alza y 6 a la baja entre los grupos de baja y alta ansiedad. Seis de ellos se identificaron como potencialmente predictivos de respuestas de miedo y ansiedad, y por tanto fueron sometidos a su validación por qRT-PCR. Cuatro de ellos fueron validados (Ucn3, Tacr3, H2-M9 y Arr3). Estos genes están implicados en la respuesta del eje hormonal HHA y en la modulación de respuestas de estrés, ansiedad y miedo (Ucn3, Tacr3: regulados a la baja en el grupo de baja ansiedad), así como en otras funciones neuroconductuales, como la inmune (H2-M9: regulado al alza en el grupo de baja ansiedad) y la emocional (Arr3: regulado al alza en el grupo de baja ansiedad) (Díaz-Morán et al., en prensa) Los datos de *microarray* referentes a la expresión genética del complejo hipocampal se encuentran en fase de análisis.

Por último, la técnica de *microarray* ha permitido hallar recientemente diferencias de expresión genética en el hipocampo entre las ratas RHA-I y RLA-I tras semanas de exposición de los animales a las pruebas de ansiedad comentadas anteriormente. Treinta y tres de estos genes están relacionados con funciones del sistema nervioso central, como respuesta hormonal, comportamiento, vulnerabilidad al efecto de las drogas, percepción y proyección neuronal. En concreto, 16 de estos genes estuvieron regulados a la baja en la cepa RLA-I con respecto a la RHA-I (e.g. Gal, Acr, Gnb3 and Rbp4), mientras que 20 aparecieron regulados al alza (e.g. Sncg, Apobec1 y Apoc1) (Blázquez-Romero et al., 2012; Díaz-Morán et al., 2013).

Todos estos resultados sugieren que la aplicación del *microarray* en modelos animales de ansiedad/miedo se perfila como una técnica analítica de gran potencial para la detección de genes candidatos a influir o estar asociados con fenotipos complejos (Morán et al., 2011). Partiendo de estas consideraciones, esta Tesis Doctoral surge como un intento de analizar los correlatos genéticos de la frustración en ratas RHA-I y RLA-I, tratando de identificar aquellos genes cuya expresión diferencial podría contribuir a las diferencias conductuales halladas entre las cepas en pruebas de pérdida de recompensa.

6. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

A. OBJETIVOS

El objetivo fundamental de la presente Tesis Doctoral fue el de ampliar la caracterización conductual de las ratas RHA-I y RLA-I en situaciones de omisión/devaluación de recompensa (frustración), así como identificar algunos de los genes cuya expresión cerebral diferencial podría estar vinculada con las diferencias observadas entre las cepas en este tipo de situaciones.

Este objetivo general puede desglosarse a su vez en los siguientes objetivos específicos:

- (1) Extender la exploración experimental iniciada en nuestro laboratorio, centrada en el estudio de los efectos conductuales de la frustración en las ratas Romanas. Para ello se emplearon paradigmas experimentales no utilizados previamente con estos animales, como el ERPC instrumental (ERPCi) y consumatorio (ERPCc).
- (2) Analizar las bases genéticas que subyacen a las diferencias en reactividad a la frustración entre estas cepas. Para ello se realizaron estudios de expresión génica cerebral utilizando la tecnología *microarray* y *qRT-PCR*. Se establecieron dos condiciones experimentales: reposo (sin experiencia conductual alguna; Estudio 2- Anexo III), y en condiciones de frustración (CSNi, Estudio 3-Anexo IV). En el primer caso se analizaron muestras de tejido cerebral completo, mientras que

en el segundo se seleccionó el hipocampo, una estructura cerebral implicada en tareas de carácter instrumental relacionadas con pérdida, como el CSNi (Flaherty et al., 1998; Franchina y Brown, 1971; Leszczuk y Flaherty, 2000).

B. HIPÓTESIS

De los objetivos que acaban de comentarse y de la literatura discutida en los antecedentes, surgen las siguientes hipótesis.

En primer lugar, los trabajos obtenidos por nuestro grupo de investigación parecen sugerir que cuando se recibe un valor de recompensa menor del que se espera en función de la experiencia previa (CSN, extinción), se ponen en marcha reacciones emocionales cuya intensidad varía dependiendo del perfil conductual/temperamental del sujeto en estudio, siendo dicha intensidad superior en aquellos animales con una reactividad emocional mayor (RLA-I vs. RHA-I) (Gómez, Escarabajal, 2009; Gómez, Morón et al., 2009; Rosas et al., 2007; Torres et al., 2005). Esta evidencia experimental coincide con lo hallado en otros estudios que emplean estirpes de animales igualmente desarrolladas sobre la base de sus diferencias extremas en temerosidad o reactividad al estrés (Bentosela y Mustaca, 2005; Flaherty y Rowan, 1989; Rowan y Flaherty, 1991). Por todo ello, sería esperable encontrar un efecto de CSN de mayor magnitud en la cepa RLA-I en comparación con la RHA-I, tanto en una tarea instrumental (mayor latencia de respuesta en el grupo devaluado -12 *pellets*/2 *pellets*- frente al control -2 *pellets*/2 *pellets*; Estudios 1 y 3-Anexos II y IV) como consumatoria (menor consumo de la solución de postcambio en el grupo experimental -22%/4%- frente al control -4%/4%: Estudio 1B).

En segundo lugar, es sabido que cuando el sujeto es expuesto a condiciones experimentales en las que se combina la presentación y la omisión de un reforzador (reforzamiento parcial) aparecen fenómenos de persistencia conductual que no sólo aumentan la resistencia a la extinción (Amsel, 1992; Domjan, 2006; Mackintosh, 1974), sino que también atenúan el CSN (ERPC; Cuenya et al., 2011; Pellegrini, et al., 2004). Este último fenómeno no ha sido explorado hasta el momento con animales genéticamente seleccionados, si bien podría predecirse que el ERPC debería ser más marcado en la cepa más sensible a este tipo de experiencias (RLA-I) en comparación con la cepa menos reactiva emocionalmente (RHA-I). Se espera encontrar, además, que estas diferencias de cepa en relación con el ERCP sean evidentes tanto en una prueba instrumental (Estudio 1-Anexo II) como en una tarea consumatoria (Estudio 1B).

Por otro lado, se plantea como hipótesis adicional que las diferencias comportamentales observadas entre las cepas se acompañarán de divergencias en la expresión de genes relacionados con conducta emocional. Éste constituye el apartado más novedoso de esta Tesis Doctoral. Así, se esperaban encontrar diferencias de cepa en la expresión de genes en ratas Romanas sometidas a condiciones de reposo (Anexo III, cerebro completo) y, sobre todo, en sujetos expuestos a la reducción súbita en la magnitud de una recompensa esperada (Anexo IV, hipocampo). Estas diferencias deberían ser patentes en genes vinculados a emociones negativas dependientes del hipocampo (Hou, 2009; Mei, 2005; Sirri 2010; Wang, 2013), así como en genes que previamente se han hallado diferencialmente expresados en las ratas Romanas (Blázquez et al., 2012; Fernández-Teruel, 2002; Zhang, 2005). No obstante, la tecnología

microarray posibilita hacer un barrido general de los niveles de expresión de miles de genes, por lo que es probable que nuestros estudios nos permitan identificar nuevos genes como candidatos a regular las respuestas de frustración.

7. RESUMEN Y DISCUSIÓN DE LOS ESTUDIOS EXPERIMENTALES

En este apartado se presentarán de manera resumida los trabajos experimentales que componen esta Tesis Doctoral, que posteriormente serán ampliados y detallados en los artículos científicos incluidos de forma anexa. En primer lugar, se realizará una aproximación general a la metodología empleada en los estudios realizados. Posteriormente se realizará un breve análisis y discusión de los resultados obtenidos en dichos estudios, poniéndolos en relación con los objetivos específicos de la presente Tesis Doctoral. Para finalizar esta sección se realizará una discusión teórica de los resultados así como una reflexión acerca de las limitaciones de nuestros estudios y las perspectivas futuras a las que nos llevan.

A. METODOLOGÍA GENERAL

SUJETOS

Para la realización de los estudios experimentales se usaron como sujetos ratas Romanas consanguíneas de Alta (RHA-I) y Baja Evitación (RLA-I), procedentes de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Los animales tenían una edad aproximada de 90 días de edad al comienzo de los experimentos, estuvieron alojados por parejas, y su ingesta estuvo controlada para mantenerlos al 80-90% de su peso *ad libitum*. Los sujetos usados para la realización de las medidas genéticas basales tuvieron libre acceso tanto a comida como a agua. Para los estudios que involucraron el uso de reforzadores apetitivos, los animales tuvieron libre acceso a agua. La temperatura del estabulario fue de aproximadamente

20°C. El ciclo de luz-oscuridad se mantuvo constante (12/12 horas), iniciándose la fase de luz a las 8:00. Las sesiones experimentales se llevaron siempre a cabo entre las 9:00 y las 14:00, y todas ellas siguieron las normas de la guía de la Unión Europea para el uso de animales de experimentación (86/609/EEC).

APARATOS, PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES Y GENÉTICOS

Tareas instrumentales

Los aparatos utilizados para la realización de los experimentos instrumentales fueron dos laberintos rectos idénticos con medidas 120 cm de largo × 11 cm de alto × 14 cm de ancho, divididos en tres secciones separadas por compuertas de cartón. La sección inicial medía 20 cm, la sección intermedia 80 cm, y la sección final 20 cm. Las paredes y el suelo de los laberintos eran de madera (pintada de color verde). La parte superior del laberinto estaba cubierta por tapas de plexiglás transparente. Como recompensa fueron utilizados *pellets* de comida (45 mg, fórmula P; Research Diets, Noyes Precision *Pellets*, Lancaster, NH). La recompensa era colocada en el suelo del extremo más distal de la caja meta. El tiempo que los animales empleaban para recorrer el laberinto hasta alcanzar la caja meta fue registrado manualmente mediante el uso de cronómetros (Extech, modelo 365510, Madrid, España). Los ensayos comenzaban con la elevación de la compuerta de inicio y terminaban cuando la rata entraba con sus cuatro patas en la caja meta.

En el experimento de ERPC (tabla 2), las ratas fueron trasladadas en sus propias jaulas desde el estabulario hasta una sala experimental adyacente en tandas de 18 animales. El suelo del aparato se aspiró y se

limpió con una solución de etanol al 5% tras la finalización de la sesión de cada tanda. El experimento se llevó a cabo en tres fases: pre-entrenamiento (habitación), precambio y postcambio. Los animales fueron sometidos a tres días de habitación al aparato. El primer día, las ratas se colocaron en la caja de salida con las dos puertas abiertas durante cinco ensayos de 1 minuto de duración (con un período inter-ensayo de aproximadamente 20 min), durante el cual podían explorar todo el laberinto. Al día siguiente, las ratas tuvieron acceso al laberinto durante dos períodos de 2 min, durante los cuales la cantidad correspondiente de recompensa de cada grupo (12 *pellets* ó 2 *pellets*) estuvo disponible en la caja meta. Además, los sujetos fueron expuestos a un ensayo adicional en el que los *pellets* se dejaron esparcidos a lo largo del laberinto. Para los grupos de refuerzo continuo y parcial (HC12-2, HP12-2, LC12-2 y LP12-2), la recompensa durante la fase de precambio fue de 12 *pellets*, mientras que para los grupos controles (H2-2 y L2-2) fue de 2 *pellets* (L y H se refieren a cepas RLA-I y RHA-I, respectivamente). Cada grupo estuvo compuesto por 6 animales. El último día de habitación consistió en tres ensayos en la caja meta con su cantidad de recompensa correspondiente, espaciados entre sí unos 20 minutos. Se permitió un máximo de 30 s para consumir los *pellets*, tras los cuales los sobrantes fueron retirados de la caja meta. Treinta minutos después de la finalización de la tercera sesión de habitación, se colocaron doce *pellets* en cada una de las jaulas, junto a la ración diaria de pienso de laboratorio correspondiente.

El entrenamiento comenzó en el cuarto día. Cada animal fue colocado en la caja de salida con la compuerta cerrada, mientras que la de la caja meta se mantuvo abierta. A continuación, la compuerta de la caja de salida se abría y la rata podía correr a lo largo del laberinto para obtener la

recompensa apetitiva correspondiente. Los grupos HC12-2 y LC12-2 recibieron 12 *pellets* por ensayo, mientras que los grupos HP12-2 y LP12-2 recibieron de forma alternada e impredecible recompensa (12 *pellets*) durante los ensayos reforzados, o nada durante aquéllos no reforzados. La secuencia de los ensayos reforzados y no reforzados se dispuso al azar mediante el uso de secuencias de Gellermann (1933), con un número similar de transiciones reforzado - no reforzado y viceversa. Los grupos controles (H2-2 y L2-2) recibieron 2 *pellets* por ensayo. Se permitió un tiempo máximo de 20 s para recorrer el laberinto hasta la caja meta. En el caso de que la rata no alcanzara la caja meta antes de ese tiempo, se le empujaba suavemente por el laberinto y se asignaba el valor de 20 s como latencia para ese ensayo. Cuando la rata llegaba a la caja meta, la compuerta de la misma se cerraba y un segundo cronómetro iniciaba la cuenta atrás, siendo de 30 s el tiempo máximo disponible para consumir la recompensa. Tan pronto como la rata terminaba de comer la recompensa, o tras 30 s, ésta se retiraba de la caja meta y se colocaba de nuevo en su jaula. Las ratas se mantuvieron en la jaula de alojamiento durante el intervalo entre ensayos. Cada rata fue expuesta a 6 ensayos por sesión todos los días. La fase de precambio duró 5 días.

En el primer ensayo de la fase de postcambio, las ratas que habían recibido 12 *pellets* (tanto las pertenecientes al grupo continuo como parcial) sufrieron una devaluación de la recompensa, pasando a disponer de 2 *pellets* por ensayo en la caja meta. Aquellos animales que, sin embargo, recibieron 2 *pellets* durante la primera fase, mantuvieron esta cantidad de reforzador también en esta segunda parte del experimento. La fase de postcambio duró 6 días, y cada sesión diaria estuvo compuesta por 6 ensayos.

Tabla 2. Diseño experimental ERPCi

CEPA	REFORZAMIENTO	PRECAMBIO	POSTCAMBIO	N	GRUPO
RHA-I	C	12	2	6	HC12-2
	P	12 ó 0	2	6	HP12-2
	Control	2	2	6	H2-2
RLA-I	C	12	2	6	LC12-2
	P	12 ó 0	2	6	LP12-2
	Control	2	2	6	L2-2

Nota: RHA-I y RLA-I se refiere a cada una de las cepas que participaron en este estudio. En cada una de las cepas existió un grupo de reforzamiento continuo (C) en el cual todos los ensayos fueron reforzados con 12 pellets durante la primera fase; un grupo de reforzamiento parcial (P) en el que sólo la mitad de los ensayos fueron seguidos de recompensa; y un grupo control que siempre recibió un bajo nivel de recompensa de forma continua. La recompensa (n° de pellets) se explicita en las columnas de pre y postcambio. N hace referencia al número de animales por condición experimental. Grupo se refiere a la nomenclatura de cada uno de los grupos que surgen de la combinación factorial de los factores Cepa y Reforzamiento.

Un procedimiento similar se utilizó para realizar el estudio de CSNi y *microarray* de hipocampo (Tabla 3). Las ratas fueron trasladadas desde el estabulario hasta una sala adyacente en sus jaulas en tandas de 8. El experimento se llevó a cabo en tres fases similares: pre-entrenamiento, precambio y postcambio. La mitad de los animales fueron de la cepa RHA-I ($n = 16$) y la otra mitad de la RLA-I ($n = 16$). La recompensa durante la fase de precambio fue de 12 *pellets* por ensayo (para los grupos H12-2 y L12-2). Para la otra mitad de las ratas de cada cepa, la recompensa se fijó en 2 *pellets* por ensayo en todas las sesiones (grupos H2-2 y L2-2). La fase de precambio duró 10 días, mientras que la fase de postcambio duró entre 1 y 3 días, dependiendo del criterio de latencia.

Tabla 3. Diseño experimental CSNi

CEPA	PRECAMBIO	POSTCAMBIO	N	GRUPO
RHA-I	12	2	8	H12-2
	2	2	8	H2-2
RLA-I	12	2	8	L12-2
	2	2	8	L2-2

Nota: RHA-I y RLA-I se refiere a cada una de las cepas que participaron en este estudio. En cada una de las cepas existió un grupo de contraste sucesivo negativo en el cual todos los ensayos de la primera fase fueron reforzados con un alto nivel de recompensa, y un grupo control que siempre recibió un bajo nivel de recompensa. La recompensa (nº de pellets) viene expresada en las columnas de pre y postcambio. N hace referencia al número de animales por condición experimental. Grupo se refiere a la nomenclatura de cada uno de los grupos que surge de la combinación de la variable cepa y reforzamiento.

El ERPC consumatorio (Tabla 4) se llevó a cabo en cajas de Plexiglás, de 30 cm de largo, 30 cm de alto, y 15 cm de ancho. Una bandeja llena de serrín se colocó en el suelo de dichas cajas para recoger las heces y la orina. Las soluciones de sacarosa estaban contenidas en buretas graduadas con tetinas que se colocaron en la caja a través de un agujero de 1,6 cm situado en el panel frontal de cada una de ellas, a 10,7 cm del suelo.

Las ratas se transportaban desde el estabulario hasta otra sala adyacente de experimentación sin sacarlas de sus jaulas, en tandas de 6. Cada rata fue asignada a una de las 6 cajas y esta asignación se mantuvo durante todo el entrenamiento. El orden en el que las tandas pasaban por las sesiones experimentales se contrabalanceó entre los días. Una vez que un grupo de ratas terminaba la sesión, los aparatos eran limpiados con trozos de papel húmedos, las heces se retiraban, y el serrín se cambiaba cada vez que era necesario. El entrenamiento consistió en un total de 20 sesiones, una por día, llevadas a cabo en dos fases: precambio (16 sesiones) y postcambio (4 sesiones). La fase de precambio fue precedida por una

sesión de habituación a la caja experimental. Durante esta sesión, las ratas se colocaron en la caja de entrenamiento durante un período de 5 min sin acceso a las correspondientes soluciones de sacarosa. La fase de precambio comenzó el segundo día. Cada animal fue colocado en la caja experimental con las tetinas unidas a las buretas graduadas. Cada rata tuvo un tiempo máximo de 5 min para consumir la solución, que se iniciaba a partir del primer contacto con la boquilla. Se registró la cantidad consumida de solución de sacarosa en mililitros (ml). Tan pronto como la rata hubo terminado la sesión de 5 min, se retiró de la caja experimental y se colocó de nuevo en su jaula.

Tras 16 sesiones en las que los animales recibieron una solución de sacarosa al 22% (continua vs. parcial) ó una solución al 4% de sacarosa, dependiendo de la condición experimental, todos los grupos recibieron una solución al 4% durante 4 sesiones consecutivas (fase de postcambio). En este experimento se formaron seis Grupos (n=6). Para los grupos HC22-4, LC22-4, HP22-4, y LP22-4, las 16 sesiones de precambio implicaron el acceso a una solución de sacarosa al 22% (preparado mediante la mezcla de 22 g de azúcar comercial por cada 78 g de agua destilada -v/v-), mientras que durante la fase de postcambio fueron expuestos a la solución de sacarosa al 4% (preparado mediante la mezcla de 4 g de azúcar comercial por cada 96 g de agua destilada -v/v-). Los grupos HC22-4 y LC22-4 recibieron recompensa en todos los ensayos, mientras que los grupos HP22-4 y LP22-4 fueron sometidos a una alternancia impredecible (R-N-R-R-N-N-R-N-R-N-N-R-N-N-R, Pellegrini et al. 2004) entre refuerzo (22% de sacarosa) y ensayos no reforzados (agua destilada). Los grupos controles H4-4 y L4-4 recibieron acceso a la solución del 4% durante todo el experimento. Las soluciones de sacarosa se prepararon cada día.

Tabla 4. Diseño experimental ERPCc

CEPA	REFORZAMIENTO	PRECAMBIO	POSTCAMBIO	N	GRUPO
RHA-I	C	22%	4%	6	HC22-4
	P	22% ó 0%	4%	6	HP22-4
	Control	4%	4%	6	H4-4
RLA-I	C	22%	4%	6	LC22-4
	P	22% ó 0%	4%	6	LP22-4
	Control	4%	4%	6	L4-4

Nota: RHA-I y RLA-I se refiere a cada una de las cepas que participaron en este estudio. En cada una de las cepas existió un grupo de reforzamiento continuo (C) en el cual todos los ensayos fueron reforzados con una solución al 22% de sacarosa durante la primera fase; un grupo de reforzamiento parcial (P) en el que sólo la mitad de los ensayos fueron reforzados mientras que en el resto los animales recibieron agua; y un grupo control que siempre recibió un bajo nivel de recompensa de forma continua. La recompensa (% de sacarosa) se explicita en las columnas de pre y postcambio. N hace referencia al número de animales por condición experimental. Grupo se refiere a la nomenclatura de cada uno de los grupos que surgen de la combinación factorial de los factores Cepa y Reforzamiento.

Procedimientos de *microarray* y *qRT-PCR*

Con el fin de alcanzar el segundo de los objetivos de esta Tesis Doctoral, se realizaron estudios neurogenéticos en ratas RHA-I y RLA-I mediante la utilización de técnicas de *microarray* y de *qRT-PCR*. Estas técnicas permitieron determinar la expresión génica diferencial en muestras de cerebro completo (condiciones basales), así como en estructuras neuroanatómicas concretas (complejo hipocampal).

La técnica de *microarray* consiste en un barrido genético que se realiza para analizar la expresión diferencial de genes, analizando los niveles de miles de ellos de forma simultánea. Su funcionamiento consiste, básicamente, en medir el nivel de hibridación entre la sonda específica (*probe*), y la molécula diana (*target*), indicándose la misma mediante fluorescencia y estimándose por análisis de imagen, una aproximación que

indica el nivel de expresión de cada gen. Por otro lado, la técnica de *qRT-PCR* se usa para validar los datos encontrados con el *microarray*, mediante la amplificación de algunos de los genes encontrados diferencialmente expresados al alza o a la baja. Esta amplificación se realiza por medio de la proteína polimerasa, que transcribe los fragmentos de ADN seleccionados. Ambos procedimientos se llevaron a cabo en el Instituto “IVIOMICS” de Valencia.

Se realizaron dos estudios genéticos. En primer lugar, se llevaron a cabo mediciones basales de expresión génica utilizando para ello cerebros enteros de ratas mantenidas *ad libitum* y que no habían sido expuestas a ningún tipo de prueba comportamental ni estresor. En segundo lugar, se analizó el complejo hipocampal tras la exposición de estas cepas de ratas a experiencias frustrantes de CSNi (12 *pellets*-2 *pellets*), y estas muestras fueron comparadas con aquellas de sujetos controles de ambas cepas (2 *pellets*-2 *pellets*).

Para la realización del análisis genético mediante la técnica de *microarray* y *qRT-PCR* las ratas fueron decapitadas y las muestras biológicas introducidas en nitrógeno líquido para posteriormente conservarse a -80°C. A continuación se detallan los procedimientos utilizados para el procesamiento de las muestras. El total de ARN fue extraído empleando el método “TRIZOL” según el protocolo recomendado por el fabricante (*Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD*). Se homogeneizaron las biopsias (1 ml reactivo TRIZOL/75mg tejido), éstas fueron incubadas en una habitación durante 5 min (0.2 volumen of TRIZOL) y se les añadió cloroformo durante 2,5 minutos. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas durante 15 min a 12,000 g (4°C). La fase acuosa fue precipitada con un volumen de 2-propanol, mantenida en hielo

durante 5 min y disuelta en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). La integridad de la muestra de ARN (procedimiento de control de calidad del ARN) fue realizada a partir del empleo de bioanalyzer 2100 (Agilent technologies, Madrid, España), ejecutando una parte alícuota de las muestras de ARN en 6000 Nano LabChip (Agilent technologies, Madrid, España; RIN: número de la integridad del ARN para la asignación de los valores de integridad en las mediciones de ARN, Schroeder y cols., 2006).

Todas las muestras fueron hibridadas en el “Whole Rat Genome Oligo *Microarray*” (“Agilent technologies”, Madrid, España) que abarca más de 55.000 sondas del ADN humano. Los protocolos de la preparación e hibridación de las muestras fueron adaptados a partir del manual técnico de “Agilent”.

En primer lugar, el ARNc se transcribió a partir de 1mg de ARN total utilizando el “T7-Oligo (dT) Promotor Primer”. Las muestras fueron transcritas “in vitro” y etiquetadas Cy-3 (utilizando el kit de Quick-AMP (“Agilent technologies”, Madrid, España). El ARNc sintetizado produce entre 10 y 15 µg. Tras un mayor saneamiento de las muestras (QIAGEN, Barcelona, España), el ARNc fue fragmentado en varias partes que fueron de 35 a 200 bases, las cuales fueron utilizadas por Agilent 2100 Bioanalyzer technology. Las muestras fragmentadas de ARNc (1.65 µg) fueron hibridadas a partir de chips con 17 h de incubación a 65°C de rotación constante, con lo que los *microarrays* se lavaron en dos etapas de 1 min en dos “buffers” de lavado (“Agilent technologies”, Madrid, España).

Los *microarrays* hibridados fueron escaneados en el escáner “Axon 4100A”, (“Molecular Devices”, Sunnyvale, CA, USA) y los datos fueron

extraídos a través del software “GenePix Pro 6.0” (“Molecular Devices”, Sunnyvale, CA, USA).

A continuación se realizó la transcripción inversa del total de ARN (0.5 µg) a partir del kit “Advantage RT-for-PCR kit” (“Clontech”, Palo Alto, CA, USA). Cada muestra se diluyó hasta un volumen final de 12.5 ml en agua tratada con DEPC, y se añadió 1 µl oligo (18-dT), calentado a 70°C durante 2 min, y se mantuvo en hielo hasta 6,5 µl mastermix–4 µl 5X reaction buffer1, µl dNTP mix of 10 mmol each, 0.5 µl recombinant RNase Inhibitor, y se añadió la transcripción inversa de 1 µl MMLV (Moloney-Murine Leukaemia Virus). La reacción fue incubada a 42°C durante 1h, y calentada a 94°C durante 5 min para detener la síntesis de ADNc y destruir la actividad de ADNasa. Los productos fueron diluidos hasta llegar a un volumen de 50 µl en agua tratada con DEPC.

Para verificar los resultados obtenidos del *microarray* de ADNc, se realizó la validación de los genes seleccionados a partir de la aplicación de la técnica *qRT-PCR* (se empleó el gen beta-actina -ACTB- como control). El nivel de expresión relativo de cada gen en relación al total de ARN fue determinado por la técnica *qRT-PCR*, empleando pares de secuencias de primers (“forward” y “reverse”) para cada gen (5’-3’).

La técnica “*Real-time qPCR*” se llevó a cabo empleando el kit de “LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit” (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) según las instrucciones del fabricante en la plataforma “Roche LightCycler” (Roche, Göttingen, Alemania). Se empleó el ADNc para cada muestra analizada. Se incluyó una curva de calibración en cada experimento (cuatro diluciones en serie).

Los productos finales fueron analizados empleando el software suministrado (“Roche Molecular bioquímicos LightCycler Software v3.5”) y los datos se presentaron como la relación entre las expresiones del gen vs. el gen beta-actina de la rata. Las curvas de fusión fueron analizadas para confirmar la especificidad de la amplificación.

B. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DEL EFECTO DEL REFUERZO PARCIAL EN EL CONTRASTE SUCESIVO NEGATIVO

El primer objetivo de este trabajo de investigación fue el de ampliar la caracterización comportamental de las ratas Romanas consanguíneas (RHA-I y RLA-I) en situaciones asociadas con la reducción y la omisión de un reforzador. Con este fin, se llevaron a cabo estudios que analizaron el ERPC instrumental y consumatorio. Este fenómeno analiza si el efecto de contraste puede verse atenuado por una experiencia crónica de frustración, inducida por un programa de refuerzo parcial administrado durante la fase de precambio (Pellegrini et al., 2004).

En relación con el ERPCi, los resultados indicaron que el efecto de contraste instrumental se observó solamente en la cepa más ansiosa (RLA-I) sometida a reforzamiento continuo durante la fase previa a la devaluación. Estos resultados fueron similares a los hallados en un estudio previo realizado con ratas hembra (Rosas et al., 2007), por lo que nuestros hallazgos amplían la obtención de diferencias de cepa en relación con el efecto de CNSi a ratas macho. Lo más importante del presente estudio es que supone la primera evidencia de que el contraste de incentivos (instrumental) no se observa en animales RLA-I que tuvieron una experiencia crónica previa de frustración inducida por reforzamiento parcial. Por lo tanto, en las ratas RLA-I, propensas a la frustración, las experiencias previas de frustración (reforzamiento parcial durante la fase de precambio) pueden contrarrestar los efectos de una nueva experiencia de frustración (devaluación de la recompensa en la fase de postcambio). Por el contrario, el ERPCi no fue observado en la cepa RHA-I, ya que las latencias de respuesta registradas durante la fase de postcambio fueron similares en todos los grupos de dicha cepa, con independencia del

programa de reforzamiento (parcial vs continuo) o de la cantidad de recompensa (12 vs 2 *pellets*) utilizados durante la fase de precambio. Esta demostración del ERPCi en ratas RLA-I, pero no en RHA-I, constituye una prueba más de la utilidad de estas cepas de animales como modelo animal válido para el estudio de las bases genéticas de la frustración.

Por otro lado, las diferencias en ejecución observadas entre las cepas RHA-I/RLA-I durante la fase de precambio del estudio del ERPCi son coherentes con resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio, en los que se usaron ratas hembras como sujetos experimentales en pruebas instrumentales similares, como el CSNi, la extinción apetitiva y el ERPE (Gómez et al., 2008; Gómez et al, de la Torre., 2009; Rosas et al., 2007). Estos trabajos indican que las diferencias de cepa aparecen sistemáticamente y con independencia de la magnitud del reforzador (12, 2 ó 1 *pellets*) y del programa de refuerzo (continuo vs parcial) utilizados durante las fases previas a la devaluación (CSN) o la omisión de reforzador (extinción apetitiva). Estas divergencias en la ejecución instrumental hallada entre las cepas podrían depender, al menos parcialmente, de las diferencias en la transmisión dopaminérgica mesolímbica observadas entre las ratas RHA-I y RLA-I, las cuales parecen modular la respuesta de los animales a las propiedades reforzantes de recompensas naturales y artificiales (ver Giorgi et al., 2007, para revisión).

Volviendo a los resultados obtenidos durante la fase de postcambio, se observó que la reducción inesperada de la magnitud de la recompensa (12-2 *pellets*) alteró significativamente la ejecución de la tarea instrumental e indujo un efecto de CSNi sólo en las ratas más ansiosas (RLA-I) expuestas a un programa de refuerzo continuo durante la fase de precambio. Por el contrario, se encontró un nivel de ejecución similar en las ratas RLA-I que

recibieron un entrenamiento con refuerzo parcial durante la primera fase con respecto a sus controles (L2-2), así como en aquellas menos ansiosas (RHA-I), con independencia en este caso del programa de reforzamiento al que fueron sometidas durante la fase de precambio (parcial o continuo).

Son muchos los resultados que sugieren que la reducción u omisión inesperada en la magnitud de una recompensa previamente presentada desencadena una respuesta emocional negativa de frustración o decepción similar al miedo/ansiedad (Gray y McNaughton, 2000). Los resultados obtenidos en el presente estudio proporcionan un apoyo adicional a esta hipótesis, ya que las ratas más ansiosas (RLA-I) mostraron un efecto de CSNi que no se observó en los animales con menos niveles de miedo/ansiedad (RHA-I). Más aún, la ausencia de efecto de CSNi en el grupo de ratas RLA-I expuesto a refuerzo parcial durante la fase de precambio, así como la ausencia de diferencias en ejecución de la tarea entre las ratas RLA-I y RHA-I expuestas a un programa de refuerzo parcial, pueden ser discutidos en este marco teórico. La persistencia comportamental observada tras una experiencia de refuerzo parcial (como el ERPE o el ERPC inducido en el presente estudio) sugiere que cualquier tipo de inconsistencia en la recompensa tiende a inducir persistencia en el comportamiento (Cuenya et al., 2011; Kamenetzky et al., 2008; Papini, 2003; Rosas et al., 2007). Aunque se han propuesto varias teorías para explicar este efecto, la mayoría de ellas consideran que los fenómenos derivados del uso del refuerzo parcial dependen básicamente de mecanismos emocionales (Amsel, 1994). En apoyo de esta hipótesis se ha observado lo siguiente: (1) la experiencia previa con reforzamiento parcial puede aumentar la resistencia conductual en situaciones posteriores frustrantes que supongan devaluación de la recompensa, tales como el

CSNc (ERPCC). Este efecto es atenuado por la administración de fármacos ansiolíticos como el clordiazepóxido (Pellegrini et al., 2004) y el etanol (Kamenetzky et al., 2008); (2) las lesiones del sistema septohipocampal anulan el ERPE instrumental (Feldon et al., 1985; Henke, 1973); (3) la administración crónica de compuestos ansiolíticos GABAérgicos durante las fases de adquisición y de extinción anulan el ERPE instrumental en tareas en las que se utiliza un procedimiento espaciado de presentación de ensayos (ver Gray, 1987; Leslie et al., 2004, para revisión), y (4) se han obtenido diferencias en resistencia a la extinción tras refuerzo parcial en ratas hembra RLA-I y RHA-I, observándose un ERPE en la primera cepa que no fue observado en la segunda (Gómez et al., 2008). Los resultados obtenidos en el presente estudio, por consiguiente, podrían ser considerados como un apoyo adicional a las teorías emocionales de fenómenos de persistencia comportamental inducidos por reforzamiento parcial (Amsel, 1992; Gray, 1987; Papini et al., 2006).

Con respecto a los resultados hallados en el experimento que estudió el ERPCC (estudio 1B), se realizó un análisis de varianza (ANOVA), con tres factores: Cepa (RHA-I vs. RLA-I), Reforzamiento (C22-4, P22-4, 4-4) y Sesiones (16 en la fase de precambio, y 4 en la de postcambio). Se realizaron ANOVAS separados para las fases de precambio y postcambio, respectivamente. En la fase de precambio se realizaron análisis separados para los ensayos en los que los sujetos del grupo P22-4 recibían reforzador y los ensayos en los que no lo recibían. Para las comparaciones a posteriori se empleó como prueba *post hoc* Tukey. El valor de significación estadística alfa se estableció en $p < 0.05$. Los análisis realizados con los datos obtenidos en la fase de precambio en los ensayos reforzados mostraron la existencia de un efecto principal de Sesiones, $F(7,147) = 75,637$, $p < 0,0001$, y

Reforzamiento, $F(2,21) = 17,707$, $p < 0,0001$. Ningún otro efecto principal o interacción fue estadísticamente significativo. Los análisis a posteriori realizados con esta última variable indicaron que los grupos que recibieron una alta magnitud de reforzamiento (C22-4, P22-4) mostraron un consumo de la solución significativamente superior al registrado en los grupos control (4-4), con independencia de la cepa ($p < 0,0001$ en ambos casos), mientras que los primeros no presentaron diferencias cuando fueron comparados entre sí.

En cuanto a los resultados obtenidos en los ensayos no reforzados, los análisis estadísticos realizados indicaron la existencia de un efecto principal de Sesiones, $F(7,154) = 22,059$, $p < 0,0001$ y Reforzamiento, $F(2, 22) = 92,802$, $p < 0,0001$, así como de la interacción entre ambas, $F(14, 154) = 6,645$, $p < 0,0001$. Para estudiar esta interacción, se analizó el efecto de la variable Reforzamiento en cada una de las sesiones no reforzadas de la fase de precambio, apareciendo, no obstante, un efecto simple de la variable Reforzamiento en todas las sesiones analizadas (valor menor de $F(2, 33) = 18, 424$, $p < 0,0001$, ensayo 2). Los análisis a posteriori realizados indicaron que, con excepción del ensayo 2 (en el que los grupos parciales de ambas cepas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí), en el resto aparecieron diferencias estadísticamente significativas entre todas las condiciones de la variable reforzamiento (reforzamiento continuo, parcial y control).

Por su parte, los análisis estadísticos realizados con los datos obtenidos en la fase de postcambio indicaron la existencia de un efecto principal de Reforzamiento, $F(2, 29) = 6,013$, $p < 0,007$ y de Sesiones, $F(3, 87) = 23,014$, $p < 0,0001$. También fue significativa la interacción de Reforzamiento x Sesiones, $F(6, 87) = 9,561$, $p < 0,0001$. Ningún otro efecto

principal o interacción fue significativo. Para analizar la interacción Reforzamiento x Sesiones, se analizó el efecto de la variable Reforzamiento en cada una de las sesiones de la fase de postcambio. Apareció un efecto simple de la variable Reforzamiento en la sesión 1, $F(2, 32) = 21,829$, $p < 0,0001$ y en la sesión 2, $F(2, 32) = 3,639$, $p < 0,038$. Las comparaciones realizadas en dichas sesiones indicaron que, en la sesión 1, los grupos de reforzamiento continuo mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los parciales ($p < 0,018$), y controles ($p < 0,0001$). Además, estas dos últimas condiciones también mostraron diferencias estadísticamente significativas cuando fueron comparadas entre sí ($p < 0,003$). Por su parte, en la sesión 2 sólo los grupos continuos y controles mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,031$). Estos resultados indican que a diferencia de los resultados obtenidos en el experimento del ERPCi, no se hallaron diferencias entre las cepas cuando se usó una tarea consumatoria para inducir frustración y persistencia en el comportamiento (ERPCc). En este caso, tanto los animales RHA-I como los RLA-I mostraron un efecto CSNc de igual magnitud al devaluar la recompensa (del 22% al 4%), siendo este efecto atenuado en todos los grupos (tanto RHA-I como RLA-I) parcialmente reforzados.

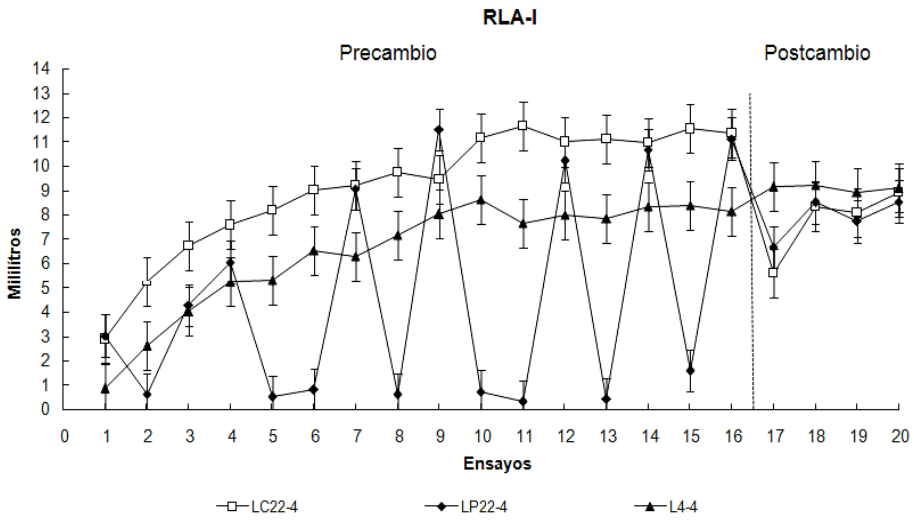


Figura 7: Consumo medio en mililitros (\pm ETM) durante las fases de precambio y postcambio en la cepa RLA-I.

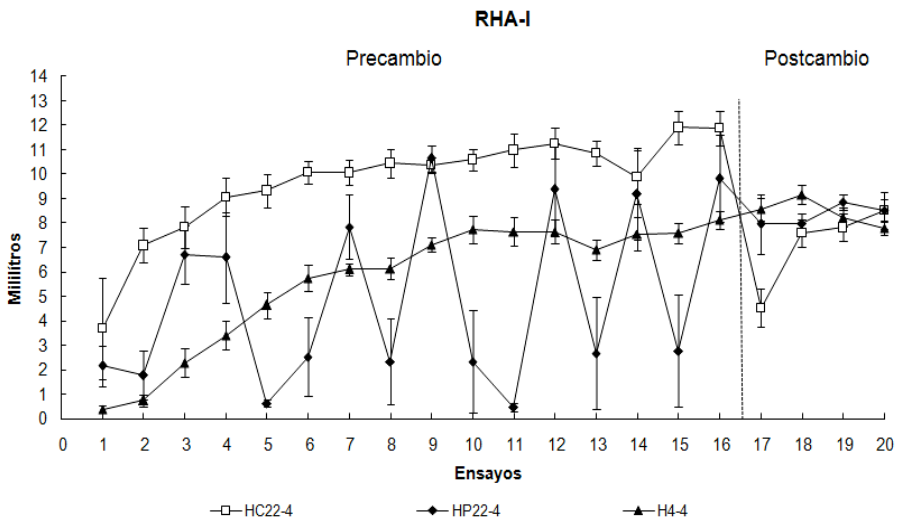


Figura 8: Consumo medio en mililitros (\pm ETM) durante las fases de precambio y postcambio en la cepa RHA-I.

Por tanto, puede afirmarse que las diferencias de comportamiento mostradas por las cepas RLA-I y RHA-I se observan claramente cuando los animales tienen que realizar una respuesta instrumental para obtener el reforzador. Por el contrario, los resultados son inconsistentes cuando la respuesta requerida implica directamente el consumo de la recompensa (Gómez, Escarabajal et al., 2009; resultados no publicados). Así, por ejemplo, estos autores (Gómez, Escarabajal et al., 2009) observaron que tanto las ratas RLA-I como las RHA-I (hembras) mostraron una supresión similar en la respuesta de consumo cuando la solución de sacarosa se redujo del 32% al 4%, en comparación con los grupos de control de ambas cepas que siempre recibieron una solución de sacarosa al 4% (CSNc; véase el Experimento 1). Por el contrario, cuando la discrepancia de la recompensa precambio-postcambio se redujo del 32%-4% al 22%-4% (Experimento 2), ambas cepas mostraron una supresión similar de la ingesta de líquidos en el primer ensayo de postcambio, si bien sólo la más emocional (RLA-I) mantuvo dicha supresión en ensayos posteriores (Gómez, Escarabajal et al., 2009) Estos resultados sugieren que las diferencias entre las ratas Romanas en paradigmas de contraste consumatorio se observan sólo cuando la disparidad entre las recompensas de precambio y postcambio no es muy grande.

Teniendo en cuenta estos hallazgos previos, en la presente Tesis Doctoral se realizó un experimento de ERPCc en el que las concentraciones de sacarosa se devaluaron del 22% al 4%, en contraste con el protocolo estándar utilizado habitualmente (32%-4%; véase Flaherty, 1996). El principal objetivo de este experimento fue comprobar si las diferencias de cepas halladas en relación con el ERPCi también podrían observarse en una tarea consumatoria. Los resultados mostraron que la experiencia previa de

reforzamiento parcial redujo el efecto CSNc, sin encontrar diferencias significativas entre las cepas (véase Figura 5 y 6). Este dato sugiere que el procedimiento consumatorio es menos sensible a la detección de diferencias en respuestas emocionales entre las cepas RLA-I y RHA-I, una conclusión consistente con estudios anteriores llevados a cabo por nuestro grupo de investigación (Gómez, Escarabajal et al., 2009; resultados no publicados). Como se indica en las páginas anteriores, las ratas RHA-I tienden a mostrar estrategias de afrontamiento activo en situaciones que implican novedad y castigo, mientras que las ratas RLA-I tienen una marcada tendencia a mostrar conductas de afrontamiento más pasivas, como la inmovilización (*freezing*) o el acicalamiento (*grooming*) (Driscoll et al., 2009; Steimer y Driscoll, 2005; Thierry y Peter, 2003). Estas diferencias podrían subyacer a la relativa falta de sensibilidad que muestran las tareas consumatorias en la detección de diferencias entre las cepas. En este sentido, sería acertado suponer que estos rasgos comportamentales opuestos serían difícilmente detectables en tareas poco demandantes como la consumatoria, en la que el animal no necesita mostrar una respuesta activa para acceder al reforzador. Por el contrario, en tareas instrumentales la necesidad de realizar una respuesta activa (por ejemplo correr a lo largo del laberinto) para obtener el reforzador puede hacer más fácil la obtención de diferencias de cepa en relación con el CSN y el ERPC. Esta posible interpretación de los resultados deberá ser evaluada en estudios futuros que incluyan no sólo la medición de la cantidad de solución de sacarosa consumida, sino también otros patrones de conducta específicos de la especie que podrían ser claramente divergentes entre las cepas (por ejemplo, el alzamiento sobre las patas traseras *-rearing-*, la deambulación, la exploración, la inmovilización o el acicalamiento), ya que estos podrían estar interfiriendo diferencialmente entre las cepas en la respuesta de

consumo, impidiendo ver diferencias entre las mismas mediante el registro único de la respuesta consumatoria. No obstante, recientemente López-Seal et al. (en prensa) han demostrado que la supresión consumatoria no se debe a un aumento de comportamientos opuestos que compiten con el de consumo, sino que es una consecuencia directa de la devaluación de la recompensa. A pesar de ello, el empleo de ratas Wistar en este estudio supone una notable diferencia con respecto a nuestros estudios, por lo que sus resultados no pueden ser directamente extrapolables a aquellos que se obtienen cuando se utilizan cepas endocriadas en función de su reactividad emocional, como es el caso que nos ocupa, ya que entre estos animales sí podrían encontrarse divergencias comportamentales relevantes, determinadas genéticamente, derivadas del impacto diferencial que supondría la devaluación u omisión de un reforzador apetitivo esperado.

C. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN HALLADA EN RATAS ROMANAS EN CONDICIONES BASALES

Los experimentos moleculares y celulares dedicados a la exploración de las bases genéticas de la conducta se han limitado tradicionalmente al estudio de genes individuales o de pequeños grupos de ellos. La técnica de *microarray* supone la evaluación simultánea de miles de genes en paralelo, lo que permite identificar perfiles de expresión génica que podrían estar relacionados con rasgos comportamentales/psicológicos complejos. Este enfoque está siendo aplicado con éxito al estudio de las relaciones cerebro-conducta (Wang et al., 2003).

El segundo objetivo de esta Tesis Doctoral fue iniciar el análisis de las bases genéticas de la frustración. Así pues, este estudio preliminar fue diseñado para comparar, en las cepas de ratas Romanas y en condiciones basales, perfiles de expresión génica a gran escala. Tras el adecuado procesamiento del tejido cerebral, la normalización de los datos y la realización de los análisis estadísticos pertinentes, se identificaron numerosos genes expresados diferencialmente entre las ratas Romanas; en concreto, 14 genes regulados al alza y 24 regulados a la baja en ratas RLA-I en comparación con sus homólogas RHA-I. Algunos de estos genes están relacionados con enfermedades neurológicas, desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso, y con rasgos comportamentales. De entre la lista de genes expresados diferencialmente (véase tabla Anexo III), cinco de ellos fueron validados por *qRT-PCR*: EPHX2, PRL, CaMKK2, CRHBP y HOMER3. Estos genes han sido relacionados con algunos de los rasgos comportamentales divergentes que muestran las ratas RHA-I y las RLA-I, como miedo/ansiedad, reactividad al estrés, búsqueda de novedad, impulsividad y vulnerabilidad al abuso de drogas (Eede, Broeckhoven, y

Claes, 2005; Luria et al., 2009; Onaka, Takayanagi, y Leng, 2010; Szumlinski, Ary, y Lominac, 2008; Wayman, Lee, Tokumitsu, Silva, y Soderling, 2008).

El gen EPHX2 se encontró regulado al alza en las ratas RLA-I en comparación con las RHA-I. Este gen (localizado en el cromosoma 8p21.2) codifica un miembro de la familia de las proteínas epóxido-hidrolasas, unas enzimas bifuncionales que se unen a epóxidos específicos y los convierten en los correspondientes dihidrodioles (Spector, 2009). La actividad de esta enzima podría estar relacionada con funciones biológicas tales como metabolismo del colesterol, regulación del tono vascular, transporte renal tubular, contractilidad cardíaca, angiogénesis, modulación de la fiebre, inflamación y antinocicepción (Conroy et al., 2010). En el cerebro de ratón, la epóxido hidrolasa se encuentra altamente expresada en astrocitos corticales e hipocampales, y también en algunas neuronas de la amígdala central, corteza, cerebelo, cuerpo estriado, y médula espinal, donde aún se desconocen sus funciones (Bianco, Agassandian, Cassell, Spector, y Sigmund, 2009; Marowsky, Burgener, Falck, Fritschy, y Arand, 2009). Luria et al. (2009) han caracterizado recientemente una colonia de ratones “*knock-out*” que carecen de este gen (EPHX2). Este genotipo ha sido asociado, en ratones machos, con una disminución de los niveles plasmáticos de testosterona, del recuento de espermatozoides y del tamaño testicular, así como con una reducción significativa de los niveles de colesterol plasmático. En comparación con los ratones normales o controles, los ratones *knock-out* mostraron niveles inferiores de conducta exploratoria en la prueba de campo abierto y una disminución de la respuesta hedónica ante la presentación de leche condensada dulce y tibia, durante siete días consecutivos. Estos resultados sugieren un papel del gen

EPHX2 en la regulación de respuestas relacionadas con ansiedad y hedonismo, rasgos repetidamente observados como divergentes entre las ratas Romanas (Driscoll, et al. 2009).

El gen PRL (prolactina) se encontró significativamente expresado al alza en la cepa RLA-I con respecto a la RHA-I. Curiosamente, son numerosas las evidencias que sugieren la implicación de la vía cerebral de la prolactina en reacciones de estrés y ansiedad, y por tanto la importancia del principal gen regulador de la misma (PRL) en estas respuestas. Así, una gran variedad de estímulos ansiogénicos, incluyendo miedo condicionado, inmovilización aguda y crónica, estímulos nociceptivos y ejercicio, activan la liberación de péptidos por medio de neuronas que regulan los niveles de prolactina en numerosas áreas cerebrales (ver Onaka et al., 2010, para revisión). No obstante, la implicación de la prolactina en el estrés y la ansiedad parece variar dependiendo del tipo de estrés (físico o psicológico) utilizado en la prueba experimental (Ratner, Yelvington, y Rosenthal, 1989; Yelvington, Weiss, y Ratner, 1984, 1985). En este sentido, se ha sugerido que el factor determinante de la elevación de los niveles de prolactina ante situaciones aversivas es el grado de control que el organismo tiene sobre el estresor en cuestión (Telner, Merali, y Singhal, 1982).

De particular interés en este contexto es el hallazgo de que tanto las cepas Romanas no consanguíneas como las consanguíneas muestran grandes diferencias en la liberación de prolactina en respuesta a la estimulación emocional relacionada con novedad. Así, la línea RLA muestra una respuesta exacerbada de la prolactina que no se observa en la línea RHA (Castanon, Dulluc, Le Moal, y Mormède, 1992; Gentsch, Lichtsteiner, Driscoll, y Feer, 1982; Steimer y Driscoll, 2005; Steimer, la Fleur, y Schulz, 1997). Esta diferencia neuroendocrina entre las cepas puede ser anulada

mediante estimulación postnatal, una conocida experiencia temprana utilizada para disminuir la reactividad emocional/temor de los animales RLA (Steimer, Escorihuela, Fernandez-Teruel, y Driscoll, 1998). El hallazgo de que el ARNm del gen de la prolactina está sobre-expresado en la cepa RLA-I en comparación con la RHA-I es coherente con estos resultados, y sugiere que la función de la prolactina podría ser uno de los rasgos neuroendocrinos claramente divergentes entre las líneas de ratas Romanas (Castanon, Perez-Diaz, y Mormède, 1995).

El gen CaMKK2 se encontró expresado al alza en las ratas RLA-I en comparación con las RHA-I. Las CaM-quinasas (CaMK) constituyen una familia de proteínas cuya actividad es inicialmente modulada por la unión de Ca²⁺/calmodulina, y posteriormente por la fosforilación de proteínas. Un miembro de esta familia, la CaMKII, es bien conocida por su papel en el desarrollo neuronal y en la modulación de la plasticidad sináptica (p.e. la potenciación y depresión a largo plazo; ver Wayman et al., 2008, para revisión). Además, este gen ha sido propuesto como candidato en la búsqueda de "moléculas de memoria" (Griffith, 2004). El aprendizaje aversivo es uno de los paradigmas de comportamiento más utilizados para investigar el papel de la CaMKII en el aprendizaje, la memoria y los trastornos relacionados con el estrés (por ejemplo, Atkins, Selcher, Petraitis, Trzaskos, y Sweatt, 1998; Murai et al., 2007; Rodrigues, Farb, Bauer, LeDoux, y Schafe, 2004). En esta línea, Mei et al. (2005) aplicaron la técnica de *microarray* para el análisis de respuestas transcripcionales que se producen en la amígdala e hipocampo tras tareas de miedo condicionado. Estos autores encontraron expresado a la baja el gen CaMKII en el hipocampo 6 horas después de una tarea de condicionamiento del miedo, un resultado que fue validado por *qRT-PCR* (Mei et al., 2005). Del

mismo modo, Kabbaj, Devine, Savage, y Akil (2000) llevaron a cabo un estudio con ratas no consanguíneas seleccionadas sobre la base de su alta (HR) vs baja (LR) tasa de locomoción exploratoria cuando eran expuestas al estrés leve que supone un nuevo entorno. Las técnicas de *microarray*, *qRT-PCR* e hibridación *in situ* mostraron que la derrota social (*social defeat*) aumentó significativamente la expresión de ARNm de CaMKII en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo de las ratas LR, pero no en las HR. Estos resultados sugieren la implicación de la molécula CaMKII en funciones de memoria y aprendizaje asociadas con experiencias emocionales negativas. Resulta interesante el hecho de que las ratas RLA-I y RHA-I muestran diferentes patrones de respuesta cuando son expuestas a estímulos de miedo incondicionados, como la prueba de “placa perforada”, donde las RHA-I realizan más cruces (Cuenya et al., 2010), así como a estímulos de miedo condicionados, como las pruebas de potenciación del reflejo de sobresalto y condicionamiento clásico del miedo, donde las ratas RLA-I muestran mayores niveles de miedo (medido por las respuestas de sobresalto o de frecuencia/tiempo de inmovilización en estos tests) (López-Aumatell et al., 2009). No obstante, se requiere de la realización de más experimentos comportamentales dirigidos a determinar si el gen CaMKII es o no el principal candidato en la búsqueda de las bases genéticas de las diferencias conductuales observadas entre estas cepas con respecto a situaciones estresantes/ansiogénicas.

El gen CRHBP se halló regulado a la baja en la cepa RLA-I en comparación con la RHA-I. Este gen codifica una proteína que pertenece a la familia proteica del factor liberador de la corticotropina (CRH), estando asociado con ansiedad, estrés y depresión a través de la modulación de la actividad neuroendocrina del CRH. Esta hormona es una de las más

importantes en la regulación de las respuestas comportamentales e inmunoendocrinas asociadas al estrés en mamíferos (Anisman, Merali, y Stead, 2008; Claes et al., 2003; Eede et al., 2005; Van der Heyden y Bradford, 1988). En roedores, se han detectado altos niveles de expresión de CRHBP en la glándula pituitaria y en áreas del cerebro tales como la corteza cerebral, el giro dentado, regiones del hipocampo (CA1, CA3), complejo amigdalino, núcleo del lecho de la estría terminal, bulbo olfatorio, y vías sensoriales asociadas con los sistemas auditivo, olfativo, vestibular y del trigémino (Seasholtz et al., 2001). En la mayor parte de estas regiones, el gen CRHBP se localiza con la proteína CRH, lo que sugiere que CRHBP podría modular, de forma inhibitoria, la actividad sináptica del CRH (Eede et al., 2005). De acuerdo con este punto de vista, se ha demostrado que las ratas Sprague-Dawley muestran un aumento de entre el doble y el triple en los niveles de ARNm de CRHBP en la glándula pituitaria después de 30-120 minutos del comienzo de una experiencia de inmovilización, mientras que la adrenalectomía impide este aumento. Del mismo modo, Lombardo et al. (2001) encontraron mayor expresión de CRHBP en la amígdala basolateral tras una experiencia estresante aguda (pero no crónica) de inmovilización. Por otra parte, Herringa, Nanda, Hsu, Roseboom, y Kalin (2004) examinaron el curso temporal de los efectos del estrés agudo inducido por inmovilización a través de los niveles de expresión de ARNm codificante del CRHBP, en la amígdala central y basolateral, hallando que estos niveles aumentaron poco después de la experiencia estresante y permanecieron elevados hasta 21 h más tarde. Este efecto fue selectivo en la amígdala basolateral, ya que el estrés no alteró los niveles de ARNm de CRHBP en la parte central del complejo amigdalino. Aunque los modelos animales que se sirven de la manipulación de la expresión de CRHBP también apoyan la importante función de esta proteína en la regulación de las respuestas

comportamentales y hormonales al estrés, se han obtenido resultados controvertidos a este respecto. Así, en comparación con sus controles, ratones machos con una sobre-expresión de CRHBP en la glándula pituitaria (α CRHBP y MT-CRHBP), así como aquellos con déficit en este gen, mostraron niveles similares de ACTH en condiciones basales y también en respuesta a un estresor como es un período de inmovilización de 30 min (Burrows et al., 1998; Karolyi et al., 1999; Lovejoy et al., 1998). Sin embargo, los ratones transgénicos α CRHBP, que presentaban con respecto a sus controles niveles de CRHBP más elevados en la glándula pituitaria anterior, mostraron un aumento significativo en la locomoción y en el número de elevaciones sobre sus patas traseras (*rearing*) en la tarea de campo abierto. En esta misma línea, se registró un mayor número de entradas a los brazos del laberinto elevado en cruz en estos animales (aumento de la actividad), así como una tendencia hacia la disminución de los niveles de ansiedad, como pudo apreciarse por el aumento del tiempo de permanencia en los brazos abiertos de dicho laberinto (Burrows et al., 1998). Por el contrario, los ratones deficientes en CRHBP pasaron significativamente menos tiempo y entraron menos veces en los brazos abiertos que sus homólogos controles, realizaron menos salidas del compartimento protegido en la tarea de emergencia luz/oscuridad y permanecieron menos tiempo en la zona central del campo abierto. Tales datos indican que los animales deficientes en CRHBP muestran un mayor índice de comportamientos relacionados con ansiedad (Karolyi et al., 1999). En su conjunto, estos resultados sugieren que el aumento de los niveles de CRHBP en respuesta al estrés podría proporcionar un mecanismo de retroalimentación dirigido a mantener la homeostasis del eje HHA (McClennen, Cortright, y Seasholtz, 1998), pudiendo, su disfunción, ser un factor de riesgo en seres humanos para el desarrollo de trastornos

relacionados con el estrés, como la ansiedad y la depresión (Eede et al., 2005). El hecho de que la expresión de ARNm CRHBP esté regulada a la baja en la cepa más reactiva al estrés (la RLA-I) con respecto a la RHA-I (ver Carrasco et al., 2008), podría ser indicativo de un deficiente funcionamiento de CRHBP en la modulación del eje HHA, una hipótesis que deberá ser analizada con mayor profundidad en futuros estudios.

Por último, el gen HOMER3 se encontró expresado al alza en las ratas RHA-I con respecto a las RLA-I. HOMER3 (localizado en el cromosoma 19p13.11) codifica un miembro de la familia de las proteínas dendríticas. Algunos miembros de esta familia regulan la función del receptor metabotrópico de glutamato tipo 1, pudiendo desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la plasticidad en las sinapsis glutamatérgicas (Fagni, Ango, Perroy, y Bockaert, 2004). Curiosamente, estas proteínas han sido implicadas en fenómenos de plasticidad cerebral relacionados con comportamientos de búsqueda de drogas y con algunos trastornos neuropsiquiátricos (Szumlinski, Kalivas, y Worley, 2006; Szumlinski et al., 2008). La expresión diferencial de este gen entre las cepas de ratas RHA-I y RLA-I resulta relevante en este contexto, dado que éstas son claramente diferentes en relación con la vulnerabilidad a la adicción (Corda et al., 2005), impulsividad (Moreno et al., 2010), conductas de búsqueda de novedad (Cuenya et al., 2010; Fernández-Teruel et al., 2002), y otros fenotipos asociados con el espectro psicótico (Fernández-Teruel et al., 2006), rasgos todos ellos que podrían estar en parte vinculados a diferencias en la neurotransmisión glutamatérgica (Giorgi, Piras, Lecca, y Corda, 2005; Guitart-Masip et al., 2008).

Aunque los resultados obtenidos en este estudio sugieren que las diferencias comportamentales características de los fenotipos de las ratas

RLA-I y RHA-I se acompañan de diferencias basales de expresión génica de proteínas clave para la modulación del miedo, el estrés, la ansiedad, y la búsqueda de novedad, nuestros datos son preliminares y deben ser considerados con cautela por varias razones. En primer lugar, nuestras conclusiones se aplican a ratas hembra y no pueden ser extrapoladas a machos hasta que se realicen experimentos con sujetos de este sexo. En segundo lugar, la tecnología de *microarray* se aplicó a muestras de cerebro completo, por lo que no disponemos de datos independientes que informen de la expresión genética diferencial entre áreas cerebrales específicas. En tercer lugar, hay que tener en cuenta que, aunque las ratas RLA-I y RHA-I han sido seleccionadas genéticamente por las diferencias que muestran en el aprendizaje de evitación, también poseen otros rasgos diferenciales. Por ejemplo, la cepa RHA muestra más comportamientos de búsqueda de novedad, actividad locomotora, impulsividad y vulnerabilidad al abuso de drogas, así como un estilo de afrontamiento activo (Driscoll et al., 2009; Giorgi et al., 2007; Moreno et al., 2010). Dado que no está clara la independencia biológica de rasgos como ansiedad, estilo de afrontamiento (pasivo/activo) e impulsividad, este hecho constituye un factor que puede crear confusión en el estudio de sus bases genéticas y en la interpretación de los resultados.

Por lo tanto, la contribución que cada uno de ellos tiene en las diferencias de expresión genética cerebral de ratas Romanas deberá evaluarse en estudios futuros con el fin de extender nuestra comprensión acerca de las bases moleculares de estos rasgos comportamentales. Además, este estudio se realizó en sujetos que, aunque fueron seleccionados en función de su reactividad emocional, se encontraban en estado de reposo. Es por ello que se planteó la realización del siguiente

experimento de esta Tesis Doctoral, con el ánimo de estudiar las bases genéticas de la frustración mediante la vinculación de ambos aspectos, el conductual y el genético.

D. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL HALLADA EN HIPOCAMPO TRAS UNA EXPERIENCIA DE FRUSTRACIÓN (CSNi) EN RATAS ROMANAS

En este estudio, ratas Romanas macho fueron expuestas a una tarea de CSNi con varios objetivos en mente. En primer lugar, explorar si existen diferencias de comportamiento observables en ratas Romanas cuando se realiza una reducción inesperada de la magnitud de una recompensa (de 12 *pellets* a 2 *pellets*), como sugieren estudios previos realizados con ratas hembra (Rosas et al., 2007). En segundo lugar, comparar los perfiles de expresión génica en el hipocampo de ratas RHA-I y RLA-I, para investigar mecanismos genéticos que correlacionen con las diferencias comportamentales observadas entre las cepas en esta tarea frustrante.

El efecto de CSNi sólo apareció en las ratas RLA-I (latencias de respuesta más altas en el grupo L12-2 en comparación con el grupo L2-2 en la fase de postcambio), lo cual supone un apoyo a las teorías que explican este efecto sobre la base de mecanismos emocionales (Flaherty, 1996; Gray, 1987; Papini, 2006). Las diferencias de comportamiento entre las ratas Romanas y entre los grupos (experimental y control) se acompañaron de divergencias en la expresión genética hipocampal de 18 genes (véase tabla en Anexo IV; Sabariego et al., submitted). Se seleccionaron seis genes para su validación por *qRT-PCR*, de los cuales cuatro mostraron la misma tendencia y tasa de cambio que la hallada en el *microarray*: TAAR2, THAP1, PKD2L1 y NANOS1. Estos genes están vinculados con rasgos comportamentales/neurobiológicos que han sido hallados como divergentes entre las ratas Romanas.

Aunque el gen *RGSL2H* (regulador de codificación de la señalización de la proteínas G2) no fue validado a través de *qRT-PCR*, consideramos relevante señalar que éste ha sido propuesto como un gen cuyo nivel de expresión está cuantitativamente relacionado con diversos índices de ansiedad comportamental en ratones (Yalcin et al., 2004), así como con estados y trastornos de ansiedad humanos (Koenen, Amstadter, y Nugent, 2009; Smoller et al., 2008). Cualquier conclusión sobre la implicación de este gen en las diferencias de cepa observadas en el paradigma de CSNi necesitará de datos adicionales que confirmen y validen los resultados obtenidos en el presente estudio.

El gen del receptor de transaminas 2 (*TAAR2*) (también conocido como *GPR58*, receptor acoplado a la proteína G 58) se halló regulado al alza en las ratas *RLA 12-2* en comparación con las *RHA 12-2*. Las transaminas constituyen una familia de compuestos endógenos con una fuerte similitud estructural a los neurotransmisores monoaminérgicos clásicos (Borowsky et al., 2001; Bunzow et al., 2001), habiendo sido propuestos como posibles moduladores de estos neurotransmisores para mantener a los mismos dentro de límites fisiológicos normales (Berry, 2007). Los receptores de transaminas se distribuyen ampliamente en los sistemas monoaminérgicos cerebrales, donde colocan con el transportador de dopamina en un subconjunto de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de monos rhesus y ratones (Xie y Miller, 2009). La feniletilamina (PEA) ha sido sugerida como un ligando endógeno de estos receptores de transaminas (Bly, 2005b; Janssen, Leysen, Megens, y Awouters, 1999). La PEA altera la función de los transportadores de monoaminas en sinaptosomas del cerebro de ratones y monos rhesus, lo que sugiere que este receptor posee

un papel modulador en la regulación de la actividad presináptica monoaminérgica (Xie y Miller, 2009).

Varias líneas de evidencia indican que niveles aberrantes de estas aminas se asocian con diversos trastornos neuropsiquiátricos, como la esquizofrenia, el trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), el abuso/dependencia de drogas, la depresión y el estrés/trastornos de ansiedad (ver Berry, 2007). Así, por ejemplo, se han registrado altos índices de PEA en muestras de orina y sangre de pacientes esquizofrénicos (O'Reilly y Davis, 1994). En la misma línea, un polimorfismo en el gen TAAR2 se ha relacionado con la esquizofrenia (Bly, 2005a). Los resultados son consistentes con la idea de que con un exceso de actividad de los sistemas de transaminas podría estar implicado en la patogénesis de la esquizofrenia (Berry, 2007).

La PEA ha sido también identificada como un posible factor de riesgo en la aparición de TDAH (Lindemann y Hoener, 2005). La PEA se ha demostrado inductora de hiperactividad y agresividad en animales de experimentación, características clínicas importantes del TDAH (Sabelli, Mosnaim, y Vazquez, 1974). Además, se ha hallado una disminución en los niveles de PEA en la orina de pacientes con TDAH, en comparación con sujetos controles y pacientes con autismo (Baker et al., 1991; Kusaga et al., 2002). Esta disminución también ha sido encontrada en el cerebro de pacientes con esta patología (Lewin, 2006), lo que sugiere una estrecha relación entre las funciones de las transaminas y algunos de los síntomas clínicos del trastorno de TDAH.

Las transaminas también han sido vinculadas a los mecanismos neurales que subyacen el abuso de drogas y la dependencia. En este

contexto, la PEA se ha propuesto como una anfetamina endógena, relacionada con los mecanismos cerebrales que subyacen a la recompensa y el refuerzo (Janssen et al., 1999). De acuerdo con este punto de vista: (1) las respuestas comportamentales ante PEA se asemejan a aquéllas observadas tras la administración de anfetaminas; (2) los animales de experimentación se autoadministran PEA; y (3) la administración crónica de PEA induce sensibilización conductual (Borison, Sabelli, Maple, Havdala, y Diamond, 1978; Greenshaw, 1984; Shannon y Thompson, 1984).

Las transaminas también han recibido mucha atención con respecto a la etiología de los trastornos afectivos, sugiriéndose que estas podrían actuar manteniendo las funciones mentales dentro de límites "normales" (Reynolds, 1979). Una vez más, la mayor parte de esta atención se ha centrado en el papel de la PEA. Los déficits en el funcionamiento/regulación de la PEA están asociados con la depresión, mientras que su elevado funcionamiento se ha relacionado con la manía (Branchek y Blackburn, 2003; Lindemann y Hoener, 2005; Reynolds, 1979; Sabelli et al., 1974). La reserpina, un medicamento que puede desencadenar episodios de depresión (Baumeister, Hawkins, y Uzelac, 2003), disminuye los niveles de transaminasa a nivel central (Boulton, Juorio, Philips, y Wu, 1977). Los efectos antidepresivos del ejercicio físico también se han relacionado con una elevación de la PEA (Szabo, Billett, y Turner, 2001).

Por último, la PEA ha sido propuesta como un ansiógeno en animales de experimentación, a dosis más bajas de que las que normalmente se requieren para provocar respuestas similares a la anfetamina (Lapin, 1990). Estos efectos ansiogénicos pueden ser anulados por el agente ansiolítico diazepam (Lapin, 1990). Paulos y Tessel (1982)

investigaron la excreción de PEA después de una experiencia estresante (paracaidismo). Estos autores encontraron que la excreción urinaria de la PEA aumentó notablemente después de la experiencia de paracaidismo. Estos cambios no se correlacionaron con cambios en el pH o en la excreción de creatinina urinaria, lo que sugiere que los resultados no se pueden explicar por un cambio global en el metabolismo (Paulos y Tessel, 1982).

Como puede comprobarse, numerosas evidencias relacionan alteraciones en las transaminas con una gran variedad de condiciones clínicas relacionadas con la neurotransmisión monoaminérgica. De acuerdo con estos resultados, varios estudios sugieren que los patrones de comportamiento que distinguen a las líneas de ratas Romanas pueden ser mediados, al menos en parte, por diferencias en las propiedades funcionales de sus sistemas dopaminérgicos y serotoninérgicos, incluyendo diferencias comportamentales en emocionalidad, estilo de afrontamiento, reactividad al estrés, impulsividad, búsqueda de novedad, y sensibilidad al efecto de diferentes drogas (D'Angio et al., 1988; Driscoll, et al., 1985; Driscoll et al., 1990; Giménez-Llort et al., 2005; Giorgi et al., 1994; Giorgi, et al., 2003; Piras, et al., 2010). De acuerdo con este punto de vista, además, la cepa RHA muestra un perfil neuroconductual con anomalías cognitivas y de atención que son características de pacientes esquizofrénicos. Por ejemplo, Fernández-Teruel et al. (2006) encontraron un efecto de inhibición latente de la respuesta de evitación en la tarea de evitación activa en dos sentidos en ratas Sprague-Dawley, mientras que este fenómeno atencional no apareció en la cepa RHA-l. Así mismo, se han descrito déficits de aprendizaje asociativo adicionales relacionados con el espectro esquizofrénico en ratas RHA, en comparación con las ratas RLA, incluyendo el condicionamiento clásico del miedo, la respuesta de sobresalto

potenciada por miedo, la aversión condicionada al sabor, y la memoria de trabajo (Aguilar et al., 2002; Escorihuela et al., 1997; Fernández-Teruel, Escorihuela et al., 1997; Martin y Bättig, 1980).

Por otro lado, la PEA se relaciona con hiperactividad y agresividad en animales de experimentación, dos de las principales características del TDAH. Coppens et al. (2013) han registrado recientemente mayores índices de agresividad en la cepa RLA usando para su estudio el paradigma “residente-intruso”, en el cual ratas macho que habían sido habituadas con anterioridad a la convivencia durante una semana en su jaula hogar con una hembra esterilizada (residente), fueron expuestas a la presencia de una rata intrusa macho. Antes de la prueba la hembra se sacaba de la jaula. Se registró la latencia de ataque por parte del residente hacia el intruso como variable dependiente, registrándose menores latencias en la cepa RLA. Estos resultados concuerdan con el hecho de que las ratas RLA presenten una regulación al alza del gen TAAR2, implicado en agresividad y relacionado con algunos otros síntomas clínicos del trastorno de TDAH.

Como se indicó anteriormente, las diferencias en la neurotransmisión dopaminérgica podrían ser la base de estas y otras divergencias de comportamiento descritas en las ratas Romanas. Así, se han hallado, en la cepa RHA comparada con la RLA: (1) niveles más elevados de dopamina en el núcleo accumbens en respuesta a la administración aguda y crónica de psicoestimulantes, morfina, y etanol; (2) mayor densidad de receptores de dopamina D1 en el núcleo accumbens; (3) mayores respuestas estereotípicas inducidas por la inyección de altas dosis de apomorfina; y (4) mayores niveles de actividad dopaminérgica prefrontal inducidos por estímulos estresantes (Cañete et al., 2003; Corda et al., 1997; Corda et al., 2005; D'Angio et al., 1988; Giorgi et al., 1997; Lecca

et al., 2004). El hecho de que las transaminas hayan sido involucradas en la modulación del sistema monoaminérgico, así como en alteraciones neuropsiquiátricas diversas, es coherente con estos hallazgos. Por tanto, las diferencias de cepa encontradas en la expresión de TAAR2 podrían explicar, al menos parcialmente, las diferencias comportamentales y neuroquímicas observadas en las mismas.

El gen THAP1 (dominio que contiene la proteína 1 asociada a la apoptosis) se encontró regulado al alza en el hipocampo de las ratas RLA 12-2 en comparación con las ratas 2-2 de la misma cepa. Las mutaciones en el THAP son una causa común de la aparición temprana y tardía de distonía primaria, un trastorno del movimiento que se manifiesta como una actividad muscular excesiva y sostenida de forma involuntaria (Peterson, Sejnowski, y Poizner, 2010). Se ha sugerido que la distonía podría implicar alteraciones en la plasticidad sináptica del cuerpo estriado, mediada por los sistemas neuromoduladores de acetilcolina y dopamina (ver Peterson et al., 2010, para revisión). Estos resultados podrían ser relevantes para la comprensión de las diferencias en locomoción que estas cepas muestran en una gran variedad de situaciones experimentales (Aguilar et al., 2004; Escorihuela et al., 1999; Moreno et al., 2010; Zeier, Baettig, y Driscoll, 1978). Además, estudios realizados *in vitro* sugieren que la THAP1 se une a la región promotora de TOR1A y regula su expresión. Este gen (TOR1A) está también asociado con la distonía primaria (Gavarini et al., 2010; Kaiser et al., 2010). Curiosamente, ratones *knock-in* para el gen TOR1A mostraron una mejora en la formación de recuerdos relacionados con miedo. Los análisis anatómicos del complejo amigdalino también indicaron que en estos ratones el número de células positivas para *c-fos* aumentó significativamente, mientras que el tamaño del núcleo central de la

amígdala se redujo significativamente (Yokoi et al., 2009). Dado que la amígdala y el hipocampo son esenciales para la expresión de una gran variedad de tareas de aprendizaje asociativo dependientes del miedo/ansiedad (incluyendo fenómenos asociados con pérdida de incentivos), el efecto de CSNi observado en ratas RLA-I en comparación con sus homólogas RHA-I podría depender de un aumento, en la primera, de la sensibilidad del gen THAP1, inducido a su vez por la devaluación de la magnitud de la recompensa.

El gen PKD2L1 (polycystickidney disease2-like 1) se encontró regulado al alza en las ratas RLA 12-2 en comparación con las ratas RHA 12-2. El receptor PKD2L1 pertenece a la familia de receptores TRP, los cuales se encuentran no sólo en las células gustativas, sino también en células cerebrales, siendo en este caso más bien un receptor de pH o sensor de protones en el líquido cerebroespinal y ventricular (véase Fuentes et al., 2010 para revisión). Este gen contribuye parcialmente a las respuestas hacia el gusto/sabor amargo en ratones, a nivel de las células gustativas fungiformes papilares y del nervio timpánico. El gusto amargo sirve para detectar el componente ácido en los alimentos y bebidas, y disuadir a los animales de la ingestión de fuentes nutritivas en mal estado, una función de gran importancia en términos evolutivos (Horio et al., 2010). Aunque la implicación de diferencias de cepa en la sensibilidad al sabor amargo parece poco probable como mecanismo responsable de los datos obtenidos en este estudio, otros resultados obtenidos en pruebas consumatorias que utilizan soluciones de sacarosa, sacarina y quinina podrían ser explicados, parcialmente, sobre la base de diferencias de cepa en palatabilidad (Fernández-Teruel, Driscoll et al., 2002; Gómez, Escarabajal et al., 2009; Razafimanalina et al., 1996).

El gen NANOS1 se halló regulado a la baja en las ratas RLA 12-2 en relación con las ratas 2-2 de esta misma línea. Este gen codifica un ARN de unión, que contiene un “motivo estructural dedo de zinc” (ZnF), que guarda similitud con otros genes de la clase “nanos” en vertebrados e invertebrados. El gen NANOS1 ha sido implicado en la formación de las células germinales, así como en el desarrollo del sistema nervioso. Aunque NANOS1 no ha sido detectado en las células germinales primordiales, se observa en los túbulos seminíferos de los testículos maduros. Además, el NANOS1 se expresa en cantidades sustanciales en los ovocitos de ratones hembra en gestación, si bien la cantidad de ARN materno se reduce rápidamente después de la fertilización, y la expresión cigótica transitoria de NANOS 1 se observa en embriones de 8 células. Doce días y medio después del coito, NANOS 1 vuelve a expresarse en el sistema nervioso central, y esta expresión continúa en el cerebro adulto, básicamente en la formación hipocampal (Haraguchi et al., 2003). Dada la importancia de esta estructura en la modulación de los fenómenos de frustración dependientes de respuestas instrumentales (Flaherty, 1996; Gray, 1987), se requieren más estudios dirigidos a analizar el papel específico del gen NANOS1 en la susceptibilidad diferencial de las ratas Romanas a las experiencias de pérdida de incentivos.

En definitiva, los hallazgos encontrados en el presente estudio sugieren que las diferencias observadas en las cepas RHA-I y RLA-I con respecto al CSNi se acompañan de divergencias en la expresión hipocampal de genes relacionados con esquizofrenia, abuso de drogas, trastornos afectivos, ansiedad, memoria del miedo, sensibilidad gustativa y desarrollo hipocampal. Algunos de estos genes podrían subyacer a las diferencias en reactividad ante la pérdida de recompensa que se observa entre las ratas

Romanas, lo que pone de manifiesto la utilidad de la técnica de *microarray* para el análisis de perfiles de expresión génica diferencial y su vinculación con rasgos comportamentales/psicológicos complejos (Díaz-Morán et al., en prensa; Díaz-Morán et al., 2011). En este sentido, la realización de estudios comparativos con las líneas Romanas puede ayudar a arrojar luz sobre las relaciones entre el genotipo, los rasgos temperamentales, y los mecanismos neurales que subyacen a la vulnerabilidad o la resistencia de los seres humanos a las experiencias de pérdida de recompensa.

*“No acabaré de descifrar las antiguas lenguas del Norte,
no hundiré las manos ansiosas en el oro de Sigurd;
la tarea que emprendo es ilimitada
y ha de acompañarme hasta el fin,
no menos misteriosa que el universo
y que yo, el aprendiz”*

Jorge Luis Borges, (Un Lector), 1969.

8. DISCUSIÓN GENERAL

El dolor físico puede entenderse como una forma natural de ayudar a los organismos a escapar y evitar condiciones ambientales que podrían resultar perjudiciales. Sin dolor, es difícil imaginar cómo la naturaleza podría mantener motivados a los individuos para escapar de los estímulos potencialmente dañinos. De hecho, todos los mecanismos cerebrales de control emocional son ancestrales o pueden considerarse "recuerdos genéticos" que permiten a los organismos anticipar eventos vitales tanto beneficiosos como amenazantes (Panksepp, 2011). A pesar del valor protector que el dolor y el miedo condicionado poseen, cabría preguntarse por el valor adaptativo de la frustración, concretamente qué funciones generales podrían subyacer a las emociones analizadas en esta Tesis Doctoral.

Si bien nuestro ambiente cambia continuamente, no todas las modificaciones que acontecen en él son relevantes: algunas son triviales mientras que otras son significativas. Los cambios significativos tienden a provocar evaluaciones emocionales de contenido hedónico. Así, por ejemplo, en una situación de CSN, la devaluación en la magnitud de un reforzador esperado es capaz de generar un estado emocional que va a determinar en gran medida el comportamiento del individuo. El proceso de condicionamiento tiene la función de proporcionar los mecanismos

necesarios para anticipar estos estados emocionales que son significativos para el organismo. Por tanto, el valor adaptativo de estos estados emocionales podría residir en su habilidad para promover cambios rápidos tanto en el aprendizaje como en la actuación. En este sentido, la frustración podría ser conceptualizada como un estado interno que facilita la interrupción de respuestas que ya no conducen a incentivos, con el fin de dirigir la conducta hacia la búsqueda de otros recursos que podrían resultar más beneficiosos. Así, si el reforzamiento genera en cierto sentido un tipo de adhesión al contexto o al lugar en el que ocurre, entonces la frustración podría ser entendida como una manera de romper ese apego y permitir al individuo buscar fuentes alternativas de recompensa (Papini, 2006).

Dado el impacto que las experiencias de pérdida pueden tener en el organismo, no es de extrañar que hayan sido objeto de estudio científico desde perspectivas básicas y aplicadas, tanto en animales como en seres humanos (Eisenberger, Lieberman, y Williams, 2003). Esta Tesis Doctoral surge con el ánimo de profundizar en el análisis psicobiológico de la frustración, estudiando algunos de los determinantes genéticos y ambientales que la determinan. El abordaje genético se realizó utilizando animales seleccionados que difieren significativamente en el rasgo comportamental de ansiedad o reactividad emocional (RHA-I y RLA-I; véase Anexo I). Los sujetos experimentales fueron sometidos a situaciones ambientales diversas (neutras, de frustración aguda -CSNi- o de frustración crónica -ERPC), con el objetivo de ampliar su caracterización comportamental y de identificar algunos de los genes cuya expresión cerebral diferencial podría subyacer a las diferencias conductuales observada entre las cepas.

El objetivo principal del primer trabajo experimental presentado fue analizar la conducta de las ratas Romanas tras la devaluación de un reforzador apetitivo esperado, comparando grupos con experiencia previa en reforzamiento continuo con otros cuyo programa de reforzamiento previo a la devaluación fue parcial (ERPC). Se pretendía comprobar si los datos previamente obtenidos en nuestro laboratorio utilizando ratas hembra (Rosas et al., 2007) podrían generalizarse a ratas macho, así como ampliar los fenómenos comportamentales estudiados con estos animales, incluyendo la influencia del reforzamiento parcial sobre el contraste.

El primer experimento de este estudio (ERPC instrumental, véase Anexo II) pretendió analizar el comportamiento de las ratas RHA-I y RLA-I en una tarea instrumental apetitiva en la que se indujo un efecto de CSN a través de la manipulación del número de *pellets* presentados en el compartimento meta de un laberinto recto. En esta situación se esperaba encontrar un mayor efecto de CSNi en la cepa RLA-I (más reactiva emocionalmente) en comparación con la cepa RHA-I (menos emocional), tal y como se había hallado en estudios realizados en nuestro laboratorio utilizando este mismo procedimiento (Rosas et al., 2007) y también empleando una tarea aversiva (Torres et al., 2005). Los resultados indicaron que en la fase de precambio, con independencia de la magnitud de la recompensa (12 *pellets* ó 2 *pellets*), las ratas RHA-I mostraron una menor latencia de respuesta en comparación con las ratas RLA-I. Además, la magnitud de la recompensa estuvo inversamente relacionada con la latencia de respuesta instrumental con independencia de la cepa, dado que los grupos expuestos a 12 *pellets* tardaron menos tiempo en alcanzar el compartimento meta que los que recibieron 2 *pellets*. En la fase de postcambio, por su parte, se observó que los efectos conductuales de CSNi y

el efecto del refuerzo parcial en el contraste aparecieron únicamente en la cepa más emocional (RLA-I), observándose un deterioro en la respuesta instrumental en el grupo LC12-2 con respecto al grupo control L2-2, mientras que el grupo LP12-2 no mostró este deterioro conductual que define el contraste.

En el segundo experimento de este primer estudio (ERPCC, datos no publicados) los animales fueron sometidos a una tarea consumatoria en la que la magnitud del reforzador fue manipulada a través de modificaciones en la concentración de sacarosa de la solución utilizada como recompensa (22%, 4%), tratando de comprobar si las diferencias de cepa en relación con los fenómenos de CSN y el efecto de reforzamiento parcial en el mismo podían ser obtenidas también en este tipo de tareas. En este caso, los resultados mostraron un efecto de CSNc, minimizado por la experiencia previa en reforzamiento parcial, sin diferencias entre las cepas. Esto sugiere que el procedimiento consumatorio es menos sensible a la detección de diferencias en respuestas emocionales entre las cepas RHA-I y RLA-I, resultado obtenido ya en estudios anteriores realizados por nuestro grupo de investigación (Gómez, Escarabajal et al., 2009). Como ya se discutió en páginas precedentes, las ratas RHA-I tienden a mostrar estrategias activas de afrontamiento ante situaciones novedosas y amenazantes, mientras que las RLA-I presentan una acusada tendencia a realizar conductas de afrontamiento de naturaleza más pasiva, como *freezing* o *grooming* (Driscoll et al., 2009; Steimer y Driscoll, 2005; Thierry y Peter, 2003). Estos rasgos comportamentales opuestos serían difícilmente detectables en tareas poco demandantes como la consumatoria empleada en este segundo experimento, mientras que en el primer experimento de este estudio la necesidad de realizar una respuesta

activa (correr a lo largo del laberinto) para obtener el reforzador pudo hacer más fácil la obtención de diferencias de cepa en relación con el CSN y el ERPC. Esta posible interpretación de los resultados deberá ser evaluada en investigaciones futuras que incluyan no sólo la medición de la cantidad de solución consumida, sino también otros patrones de conducta específicos de la especie que podrían ser claramente divergentes entre las cepas, pero que estarían interfiriendo por igual en la respuesta de consumo, impidiendo ver diferencias entre las mismas en esta variable dependiente.

La influencia que la genética tiene en el aprendizaje de evitación activa en roedores ha sido bien establecida, sin embargo sus bases moleculares mediante el uso de cepas de ratas genéticamente seleccionadas siguen siendo poco conocidas. Algunos investigadores han realizado estudios genéticos basales en el hipocampo tanto de ratas Romanas (Blázquez-Romero et al., 2012) como de ratas Syracuse (Zhang, Amstein, Shen, Brush, y Gershenfeld, 2005) de Alta y Baja Evitación, partiendo del importante papel de esta estructura en ansiedad y en procesos que implican la inhibición comportamental (Gray, 1982). En este contexto, el segundo de los estudios que componen esta Tesis Doctoral tuvo como principal objetivo investigar acerca de las bases genéticas de la frustración utilizando para ello ratas Romanas como sujetos experimentales. Para ello se realizó previamente un estudio en el que se analizaron, mediante la tecnología de *microarray*, muestras de cerebro completo en condiciones basales (véase Anexo III). Con ello se pretendió esclarecer si existen o no diferencias genéticas relevantes entre estas cepas de ratas, ampliando los hallazgos encontrados por otros investigadores que realizan sus experimentos con este tipo de ratas (Carrasco et al., 2008;

Díaz-Morán et al., 2012; Gómez et al., 2008; Gómez, Escarabajal et al., 2009; Gómez, de la Torre et al., 2009; Manzo et al., 2012). Los resultados mostraron un gran número de genes expresados diferencialmente entre estas líneas de roedores (14 genes regulados al alza y 24 regulados a la baja en ratas RLA-I en comparación con sus homólogas RHA-I). Algunos de estos genes están relacionados con enfermedades neurológicas, desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso, así como con rasgos comportamentales diversos. Basándonos en la bibliografía disponible acerca de estos genes, seleccionamos siete de ellos para su validación mediante *qRT-PCR*, y cinco de ellos fueron validados (EPHX2, PRL, CaMKK2, CRHBP y HOMER3). Estos genes han sido asociados con algunos de los rasgos comportamentales que son divergentes entre las ratas RHA-I y las RLA-I, como por ejemplo miedo/ansiedad, reactividad al estrés, búsqueda de novedad, aprendizaje emocional, impulsividad y vulnerabilidad al abuso de drogas (Eede, Broeckhoven, y Claes, 2005; Luria et al., 2009; Onaka, Takayanagi, y Leng, 2010; Szumlinski, Ary, y Lominac, 2008; Wayman, Lee, Tokumitsu, Silva, y Soderling, 2008). Resulta sorprendente que ninguno de estos genes coincidiera con aquellos encontrados por otros investigadores que también se sirven de las ratas Romanas para la realización de sus experimentos (Blázquez-Romero et al., 2012) o de otras líneas de ratas similares como, las ratas Syracuse de Alta (SHA) y Baja (SLA) Evitación (véase Anexo I) (Zhang et al., 2005). Estas diferencias pudieron deberse a factores diversos, entre los que destacan: (1) El hecho de que en nuestra investigación las muestras fueron de cerebros completos, mientras que en los citados estudios tan solo se analizó el área hipocampal; (2) las ratas Syracuse derivan de la cepa Long-Evans, mientras que las Romanas lo hacen de la cepa Wistar; (3) la limitación que supone la variabilidad de los genes que son poco abundantes, dificultando la detección de diferencias.

Para la detección de cambios de pequeña magnitud en estos genes, podrían utilizarse más cantidad de muestras (replicados biológicos) y más repeticiones de *microarrays* por línea (Peng et al., 2003); (4) la heterogeneidad genética que implican los rasgos de ansiedad y aprendizaje del miedo, por lo que similares fenotipos comportamentales pueden ser explicados por vías genéticas diferentes; (5) el diseño experimental puede suponer divergencias en la expresión genética, ya que ésta es muy sensible a cambios en el medio, incluso aunque estos parezcan no tener importancia (Seltmann et al., 2005).

Finalmente, el tercer estudio de esta Tesis Doctoral (véase Anexo IV) buscó aunar las perspectivas de investigación comportamental y genética con el fin de ampliar el conocimiento acerca de los correlatos psicogenéticos de la frustración. En este experimento, se expuso a las cepas de ratas Romanas a la devaluación en la magnitud de un incentivo esperado (CSNi), y tras esta experiencia se extrajo y analizó el hipocampo mediante tecnología *microarray*. Se esperaban encontrar resultados comportamentales similares a los obtenidos en estudios previos realizados con ratas Romanas hembra (Rosas et al., 2007), así como comparar los perfiles de expresión génica a gran escala en el hipocampo, una estructura clave en la regulación del impacto de los estados emocionales de frustración sobre respuestas instrumentales (Flaherty, Coppotelli, Hsu, y Otto, 1998; Franchina y Brown, 1971; Leszczuk y Flaherty, 2000).

El efecto CSNi sólo apareció en las ratas RLA-I (latencias de respuesta más altas en el grupo 12-2 en comparación con el grupo de 2-2 en la fase de postcambio). Las diferencias de comportamiento entre las ratas Romanas (así como aquellas registradas entre los grupos experimental y control de ratas RLA-I) se acompañaron de divergencias en

la expresión hipocampal de 18 genes (véase Tabla en Anexo IV). De estos genes, seis fueron seleccionados para su validación por *qRT-PCR*, validándose cuatro de ellos. Estos genes, al igual que los hallados en el estudio de *microarray* realizado en condiciones basales, podrían tener vinculaciones relevantes con rasgos comportamentales y neurobiológicos que han demostrado ser divergentes entre las ratas Romanas (TAAR2, THAP1, PKD2L1 y NANOS1), una hipótesis que tendrá que ser evaluada en estudios futuros.

Las diferencias de cepa encontradas en estos estudios en relación con el CSNi (Estudios 1A y 3- Anexos II y IV) así como del efecto diferencial que el refuerzo parcial ejerce sobre el mismo dependiendo de las características psicogenéticas de los sujetos empleados (Estudio 1A), suponen una prueba empírica que apoya aquellos planteamientos teóricos que explican estos efectos sobre la base de mecanismos emocionales (Flaherty, 1996; Gray, 1987; Papini, 2006). El fenómeno de ERPC además, es un fenómeno que puede ser también considerado como un aprendizaje paradójico, ya que no puede ser explicado por las teorías clásicas del aprendizaje. En efecto, el reforzamiento parcial hace que la respuesta instrumental asociada al mismo sea más resistente a la extinción (ERPE) y al contraste (ERPC) que cuando se utiliza un programa de reforzamiento continuo, incluso cuando este último provee de más ensayos reforzados (Papini, 2006). Según las teorías clásicas, este factor debería hacer más fuerte la asociación entre el estímulo y la respuesta y por consiguiente, tras la devaluación u omisión se esperarían que el grupo reforzado de manera continua persistiera más en su respuesta, lo cual no ocurre (Papini, 2003). Así, de acuerdo con Baquero y Gutiérrez (2007), existen situaciones en las

que los individuos que responden más persistentemente son aquellos que no siempre reciben las consecuencias que esperan de su comportamiento.

Por otro lado y con respecto al apartado genético de esta Tesis Doctoral (Estudio 3, Anexo IV), algunos de los genes encontrados podrían ser parte del sustrato biológico de las diferencias en reactividad ante la pérdida de recompensa que se observa entre las ratas Romanas. El surgimiento del *microarray* durante los últimos años del siglo XX ha permitido mejorar el rendimiento obtenido por las anteriores técnicas, siendo actualmente el “*microarray* de expresión génica” la técnica de análisis más aplicada en genómica funcional y en el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a los estados de ansiedad/miedo (Morán et al., 2011; Wang et al., 2003), puesto que permite la identificación de mecanismos fisiopatológicos a partir de la comparación de los patrones de expresión de miles de genes en paralelo en varias muestras del mismo tipo de tejido (Irwin, 2001; Martínez-Conejero y Horcajadas, 2008).

Sin embargo, y a pesar de la demostrada utilidad de esta técnica para el análisis de perfiles de expresión génica diferencial y su vinculación con las divergencias halladas entre estas líneas de animales con respecto a rasgos tanto comportamentales como psicológicos (Díaz-Morán et al., en prensa; Morán et al., 2011), la transformación de estos datos en conocimiento biológico requiere un análisis adecuado de los mismos, y son necesarios una serie de pasos previos antes de llegar a una interpretación final apropiada (Esteban, Cano, y de la Haza, 2008).

En primer lugar, el adecuado diseño experimental es un punto clave, ya que la expresión de los genes es muy sensible a cambios en el medio, incluso aunque estos parezcan no tener importancia (Seltmann et

al., 2005). Es por ello que el control experimental, aunque imprescindible en toda investigación, se convierte en una parte clave en los estudios que utilizan *microarrays* para el análisis de muestras biológicas. Por lo tanto, dado que en muchos casos no pueden controlarse todas las variables con influencia potencial, para generar datos de *microarrays* que puedan ser interpretables es muy importante que el proceso de muestreo sea aleatorio para cada grupo experimental. Es igualmente importante disponer de un número suficiente de replicados biológicos (sujetos) para cada grupo, de modo que la potencia estadística aumente (Esteban et al., 2008). Sin embargo, los replicados de la misma muestra sólo nos permiten tener un control técnico del proceso, pero no incluye la variabilidad biológica poblacional necesaria como para poder detectar diferencias entre las distintas poblaciones o grupos experimentales (Churchill, 2002).

Otra de las limitaciones que presentan los estudios que utilizan la tecnología de *microarray* para realizar el análisis genético de sus muestras es la elección del momento de extracción de las mismas. Los eventos moleculares que acontecen a nivel celular no se dan de manera simultánea, y la toma de decisiones acerca de cuándo extraer las muestras de tejido en cada caso es siempre un trabajo arduo. Sirri et al. (2010), por ejemplo, realizaron un estudio de *microarray* utilizando el paradigma de miedo condicionado, y encontraron grandes diferencias entre aquellos genes expresados diferencialmente tras un breve periodo de la finalización de la tarea (30 min) en comparación con lo hallado en momentos posteriores (tras 2h y 6 h). Los genes expresados de forma más inmediata fueron predominantemente factores de transcripción. Los hallados tras 2h de la prueba fueron principalmente enzimas relacionadas con el plegamiento proteico, demostrando que nuevas proteínas son traducidas durante esta

etapa. Seis horas después de la finalización de la tarea los genes expresados diferencialmente entre los grupos fueron muy diferentes, y de hecho, algunos de los que se encontraron regulados a la baja (c-fos, Egr1) estuvieron regulados al alza en la condición anterior (2h). Estos autores explican estos resultados sugiriendo que muchos de los productos derivados de esos genes probablemente deban estar regulados a la baja para lograr una modificación sináptica estable que asegure la formación de recuerdos (Sirri et al., 2010). En el tercer estudio de esta Tesis Doctoral (Anexo IV) las muestras cerebrales se tomaron tras 2 h y media del final de la tarea. La elección de este tiempo estuvo basada en la revisión de estudios anteriores en los que se llevaron a cabo procedimientos comportamentales similares y en los que se utilizó este intervalo de tiempo (Kabbaj, Evans, Watson, y Akil, 2004).

Por otro lado, la elección de las estructuras cerebrales a analizar es también un aspecto importante a tener en cuenta a la hora de aplicar la tecnología de *microarray*, ya que pueden existir genes expresados diferencialmente en un área y que estos no se hallen significativos por la expresión a la baja de los mismos en otra región. De este modo se estaría impidiendo registrar las variaciones en la expresión génica específicas de cada estructura. Esta situación pudo haberse producido por ejemplo, en el segundo estudio que integra esta Tesis Doctoral (Anexo III), en el que se tomaron medidas basales en muestras de cerebros completos pertenecientes a las dos cepas de ratas Romanas. No obstante, y como se ha comentado previamente, los resultados de expresión genética que obtuvimos en este estudio no coincidieron tampoco con los genes que otros investigadores registraron realizando también medidas basales, pero específicamente del complejo hipocámpico (Blázquez-Romero et al., 2012),

por lo que habrá que identificar en futuros experimentos otros posibles factores adicionales que puedan estar relacionados con estos resultados no consistentes entre estudios.

Los resultados de expresión génica también se ven afectados por la plataforma de *microarray* utilizada, ya que la preparación de las muestras, la hibridación y el procesamiento de las imágenes de fluorescencia resultantes varían de una a otra (Hardiman, 2004). Una vez obtenidos los datos de expresión, y antes de comenzar la búsqueda de genes diferencialmente expresados, es necesario llevar a cabo una normalización de los datos (Do y Choi, 2006), con el fin de eliminar diferencias sistemáticas obvias entre las muestras; por ejemplo, la cantidad de ARNc marcado debe ser la misma en todas las muestras. La detección de genes que muestren una expresión diferencial en distintos tipos de muestras de modo reproducible es quizás el paso más importante en el análisis de *microarrays* (Steinhoff y Vingron, 2006). Puesto que en el *array* hay miles de genes, una gran cantidad de los valores de significación estadística (p-valores) pueden ser falsos positivos. Esta es otra limitación que trata de solventarse mediante diferentes métodos de corrección (Dudoit, Shaffer, y Boldrick, 2003), como el de Bonferroni o el denominado FDR (*false discovery rate*), de mayor uso en el análisis de *microarray* (Esteban et al., 2008). Una vez seleccionados los genes diferencialmente expresados, la interpretación de los resultados también requiere de especial atención, ya que esto conlleva una reducción de la dimensionalidad de los datos obtenidos, con el fin de detectar los factores o procesos principales que subyacen a los mismos. Entre los diferentes métodos que pueden usarse con este fin destacan el Análisis de *cluster* (o métodos de agrupamiento) y el Análisis de Componentes Principales (PCA), así como la anotación

funcional de resultados, bien manualmente o mediante el uso de programas diseñados al efecto. En definitiva, el espectacular avance tanto tecnológico como metodológico que se está produciendo en torno al estudio de las bases genéticas de rasgos tanto biológicos como comportamentales proporciona una información muy valiosa que, no obstante, conlleva la generación de multitud de datos cuyo análisis e interpretación no es trivial. Esto ha generado el desarrollo de nuevas áreas de conocimiento de carácter multidisciplinar centradas en el análisis de datos masivos. Así, la Bioinformática es un buen ejemplo de cómo disciplinas del campo de la Biología y de la Informática se han unido para enfrentarse a los nuevos retos originados como respuesta al desarrollo metodológico de las ciencias de la vida (Esteban et al., 2008). La Bioinformática es, por tanto, la aplicación de toda la capacidad de cómputo actual de los ordenadores, así como de los métodos computacionales (informáticos) en el análisis de datos experimentales y la simulación de diferentes sistemas biológicos. El surgimiento de esta disciplina contribuye, por tanto, a paliar algunas de las principales limitaciones que suponen técnicas como las de *microarray* por la enorme cantidad de datos que genera, a la vez que supone una valiosa herramienta para la comprensión de los procesos psicológicos complejos desde una perspectiva molecular.

En definitiva, y a pesar de las limitaciones comentadas, los resultados de expresión génica presentados en esta Tesis Doctoral constituyen un apoyo más a la utilidad de las ratas Romanas para la investigación neurogenética de rasgos emocionales relacionados con la pérdida de incentivos. Y es que en la actualidad no existen dudas de que los rasgos de personalidad tienen una base biológica (Mehta y Gosling, 2006), siendo el empleo de modelos animales una de las herramientas de

investigación más exitosas a este respecto (Gosling y Mollaghan, 2006). Además, como se ha venido comentando en párrafos anteriores, la emergencia de nuevas metodologías en genómica, neurociencia y fisiología, está haciendo que la contribución que la investigación animal ofrece sea mejor cada día. Pese a que la investigación animal no debe reemplazar la investigación con humanos, los estudios animales han enriquecido nuestra comprensión acerca de las bases biológicas de la personalidad humana, y parece que continuarán haciéndolo. En concreto, Mehta y Gosling (Mehta y Gosling, 2006) proponen cinco ventajas esenciales que la investigación animal puede aportar al estudio de la personalidad: (1) mejor control experimental –permiten manipulaciones experimentales que no serían posibles en humanos: hormonales, farmacológicas, genéticas, ambientales-; (2) mayor habilidad para medir parámetros fisiológicos como densidad de receptores, expresión genética, aplicación de técnicas de neuroimagen de manera más precisa; (3) más oportunidades para realizar observaciones naturalistas; (4) los animales de experimentación tiene una vida más corta, lo que permite realizar estudios longitudinales más fácilmente; y (5) mejores ocasiones para examinar las relaciones personalidad-salud, lo cual se deriva de las ventajas 1 y 2; además los modelos animales pueden también indagar más profundamente acerca de los mecanismos psicobiológicos y los procesos de desarrollo que subyacen a estas relaciones (e.g., Capitanio, Mendoza, y Baroncelli, 1999).

Así pues, los modelos animales son una importante herramienta no sólo para la ciencia básica, sino también para la ciencia aplicada, dado que aportan conocimientos muy útiles acerca de las bases psicobiológicas de rasgos de personalidad, aprovechando los elementos comunes que existen entre animales y humanos, al menos en los procesos cerebrales básicos de

la emoción, motivación, percepción, aprendizaje y memoria (Overmier, 2007).

Sin embargo, hemos de tener en cuenta las diferencias individuales existentes entre los rasgos de personalidad y las distintas estrategias de afrontamiento que de ellos se derivan. La noción de que genética y ambiente ejercen efectos diferentes sobre el comportamiento es hoy en día considerada como simplista y obsoleta. Es de acuerdo general en la comunidad científica que sobre la expresión genética influyen ambos, herencia y ambiente (Hamer, 2002). La variación en la expresión genética afecta a la actividad proteica, procesos cerebrales, y al comportamiento en última instancia. En este sentido, gracias a la investigación que se lleva a cabo con animales (como la desarrollada en esta Tesis Doctoral), los psicólogos estamos empezando a comprender de qué modo la interacción entre procesos ambientales y hereditarios influye sobre la actividad genética y las diferencias individuales. No obstante, este proceso no debe ser tomado como una calle de un solo sentido, porque a pesar de toda la información útil que se deriva de los estudios animales para la investigación con humanos, el mejor progreso siempre se consigue cuando un campo aprovecha las lecciones que emergen de otro y viceversa. Hay mucho que aprender de la literatura que se deriva de los estudios con humanos y en efecto, ésta resulta muy útil cuando se traslada al dominio animal (Mehta y Gosling, 2006). Por ejemplo, la frustración y la euforia son emociones que se experimentan como consecuencia de la divergencia entre las recompensas observadas y obtenidas. A pesar de la existencia de una gran variabilidad individual en las respuestas hacia este tipo de situaciones en animales, esta variación es mucho mayor y más fácilmente apreciable en

humanos, lo cual puede ser muy beneficioso en la interpretación de nuestros datos.

Finalmente, cabe realizar una breve reflexión acerca de las posibles implicaciones que pueden derivarse de los resultados comportamentales y genéticos obtenidos en esta Tesis Doctoral. En nuestra vida cotidiana generamos expectativas en relación con los refuerzos que podemos recibir, y nos encontramos con frecuencia con cambios inesperados en los mismos. Nuestro nivel de adaptación y tolerancia a las modificaciones del ambiente condicionan nuestro funcionamiento biopsicosocial, y el modo en que respondemos ante una experiencia de este tipo no es el mismo en todos los individuos. La mayoría de nosotros generamos respuestas análogas ante estresores físicos intensos, como podría ser el ataque de un león (en el que la respuesta más probable sería la de huida). Sin embargo, existe una inmensa variabilidad interindividual en la magnitud y cualidad de las respuestas ante estresores psicológicos moderados, como la frustración (Sapolsky, 1994). Así pues, la frustración no es una respuesta unívoca (en el sentido más comúnmente utilizado de reducción del consumo del reforzador o de la respuesta instrumental asociada al mismo), sino que los animales presentan distintos indicadores comportamentales, fisiológicos, bioquímicos y neuroendocrinos, asociados con la pérdida de incentivos. El estudio de los factores genéticos y ambientales que modulan esta respuesta diferencial constituye el principal objetivo de esta Tesis Doctoral, convirtiéndose en un gran reto científico para nuestro grupo de investigación en años venideros.

9. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que pueden extraerse de la presente Tesis Doctoral son las siguientes:

1. La experiencia de frustración que supone un programa de reforzamiento inconsistente reduce las reacciones emocionales derivadas de la devaluación posterior de la recompensa.
2. Estos efectos atenuantes de la frustración se observan solo en aquellos organismos especialmente reactivos ante esos eventos estresantes cuando la tarea es de carácter instrumental (esto es, en la cepa RLA-I con respecto a la RHA-I).
3. Los niveles de expresión de genes relacionados con rasgos comportamentales que se han mostrado divergentes entre las ratas RHA-I y las RLA-I (p.e. miedo, reactividad al estrés, búsqueda de novedad, impulsividad, vulnerabilidad al abuso de drogas, esquizofrenia, trastornos afectivos, memoria del miedo, sensibilidad al sabor y desarrollo hipocampal) se muestran divergentes entre estas cepas de ratas, tanto en estado de reposo como tras una experiencia de CSNi.
4. Los resultados genéticos aquí presentados apoyan la utilidad de las ratas Romanas para la investigación neurogenética de rasgos emocionales relacionados con la pérdida de los incentivos.

10. REFERENCIAS

- Adams, J. P., & Sweatt, J. D. (2002). Molecular psychology: Roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 42(1), 135-163.
- Aguado, L. (2005). *Emoción, afecto y motivación*. Madrid: Alianza Editorial.
- Aguilar, R., Escorihuela, R. M., Gil, L., Tobeña, A., & Fernández-Teruel, A. (2002). Differences between two psychogenetically selected lines of rats in a swimming pool matching-to-place task: Long-term effects of infantile stimulation. *Behavior Genetics*, 32(2), 127-134.
- Aguilar, R., Gil, L., Fernández-Teruel, A., & Tobeña, A. (2004). Genetically-based behavioral traits influence the effects of shuttle box avoidance overtraining and extinction upon intertrial responding: A study with the roman rat strains. *Behavioural Processes*, 66(1), 63-72.
- Aguilar, R., Gil, L., Gray, J. A., Driscoll, P., Flint, J., Dawson, G. R., . . . Tobeña, A. (2003). Fearfulness and sex in F2 roman rats: Males display more fear though both sexes share the same fearfulness traits. *Physiology & Behavior*, 78(4-5), 723-732.
- Aleman, A., Swart, M., & van Rijn, S. (2008). Brain imaging, genetics and emotion. *Biological Psychology*, 79(1), 58-69.
- Alstott, J., & Timberlake, W. (2009). Effects of rat sex differences and lighting on locomotor exploration of a circular open field with free-standing central corners and without peripheral walls. *Behavioural Brain Research*, 196(2), 214-219.

- Amsel, A. (1992). *Frustration theory: An analysis of dispositional learning and memory*. Cambridge University Press.
- Amsel, A. (1994). *Précis of frustration theory: An analysis of dispositional learning and memory*. Springer, New York.
- Anisman, H., Merali, Z., & Stead, J. D. (2008). Experiential and genetic contributions to depressive-and anxiety-like disorders: Clinical and experimental studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(6), 1185-1206.
- Atkins, C. M., Selcher, J. C., Petraitis, J. J., Trzaskos, J. M., & Sweatt, J. D. (1998). The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nature Neuroscience*, 1(7), 602-609.
- Baker, G. B., Bornstein, R., Rouget, A., Ashton, S., Van Muyden, J., & Coutts, R. (1991). Phenylethylaminergic mechanisms in attention-deficit disorder. *Biological Psychiatry*, 29(1), 15-22.
- Baquero, A., & Gutiérrez, G. (2007). Abram amsel: Teoría de la frustración y aprendizaje disposicional. *Revista Latinoamericana De Psicología*, 39(3), 663-667.
- Bardo, M., Donohew, R., & Harrington, N. (1996). Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behavioural Brain Research*, 77(1), 23-43.
- Barlow, D. H. (2004). *Anxiety and its disorders: The nature and treatment of anxiety and panic*. The Guilford Press.

- Baumeister, A. A., Hawkins, M. F., & Uzelac, S. M. (2003). The myth of reserpine-induced depression: Role in the historical development of the monoamine hypothesis. *Journal of the History of the Neurosciences*, *12*(2), 207-220.
- Becker, H. C., & Flaherty, C. F. (1982). Influence of ethanol on contrast in consummatory behavior. *Psychopharmacology*, *77*(3), 253-258.
- Becker, H. C., Jarvis, M. F., Wagner, G. C., & Flaherty, C. F. (1984). Medial and lateral amygdectomy differentially influences consummatory negative contrast. *Physiology & Behavior*, *33*(5), 707-712.
- Bentosela, M., & Mustaca, A. E. (2005). Efectos del contraste sucesivo negativo consumatorio en ratas hipertensas: ¿Una cuestión de memoria?. *Suma Psicológica*, *12*(1), 87-100.
- Berry, M. (2007). The potential of trace amines and their receptors for treating neurological and psychiatric diseases. *Reviews on Recent Clinical Trials*, *2*(1), 3-19.
- Bianco, R. A., Agassandian, K., Cassell, M. D., Spector, A. A., & Sigmund, C. D. (2009). Characterization of transgenic mice with neuron-specific expression of soluble epoxide hydrolase. *Brain Research*, *1291*, 60-72.
- Bioconductor packages ([http:// www.bioconductor.org/](http://www.bioconductor.org/))
- Black, R. W. (1968). Shifts in magnitude of reward and contrast effects in instrumental and selective learning: A reinterpretation. *Psychological Review*, *75*(2), 114.

- Blalock, E. M., Chen, K., Sharrow, K., Herman, J. P., Porter, N. M., Foster, T. C., & Landfield, P. W. (2003). Gene *microarrays* in hippocampal aging: Statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *The Journal of Neuroscience*, *23*(9), 3807-3819.
- Blanchard, R. J., Griebel, G., Henrie, J. A., & Blanchard, D. C. (1997). Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *21*(6), 783-789.
- Blázquez-Romero, G., Díaz-Moran, S., Palència, M., Mont-Cardona, C., Cañete, T., Martínez-Membrives, E., . . . Esteban, F. J. (2012). *Hippocampal gene expression profile in inbred roman high- (RHA-I) and low- (RLA-I) avoidance rats*. Poster presented at the FENS Forum of Neuroscience VIII (Barcelona, Spain).
- Blohm, D. H., & Guiseppi-Elie, A. (2001). New developments in *microarray* technology. *Current Opinion in Biotechnology*, *12*(1), 41-47.
- Bly, M. (2005a). Examination of the trace amine-associated receptor 2 (TAAR2). *Schizophrenia Research*, *80*(2), 367-368.
- Bly, M. (2005b). Mutation in the vesicular monoamine gene, SLC18A1, associated with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, *78*(2), 337-338.
- Borison, R. L., Sabelli, H. C., Maple, P. J., Havdala, H. S., & Diamond, B. I. (1978). Lithium prevention of amphetamine-induced 'manic' excitement and of reserpine-induced 'depression' in mice: Possible role of 2-phenylethylamine. *Psychopharmacology*, *59*(3), 259-262.

- Borowsky, B., Adham, N., Jones, K. A., Raddatz, R., Artymyshyn, R., Ogozalek, K. L., . . . Pathirana, S. (2001). Trace amines: Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(16), 8966-8971.
- Boulton, A., Juorio, A., Philips, S., & Wu, P. (1977). The effects of reserpine and 6-hydroxydopamine on the concentrations of some arylalkylamines in rat brain. *British Journal of Pharmacology*, 59(1), 209-214.
- Branchek, T. A., & Blackburn, T. P. (2003). Trace amine receptors as targets for novel therapeutics: Legend, myth and fact. *Current Opinion in Pharmacology*, 3(1), 90-97.
- Broadhurst, P. (1975). The maudsley reactive and nonreactive strains of rats: A survey. *Behavior Genetics*, 5(4), 299-319.
- Bronstein, J., Popper, P., Micevych, P., & Farber, D. (1996). Isolation and characterization of a novel oligodendrocyte-specific protein. *Neurology*, 47(3), 772-778.
- Brush, F. R., Baron, S., Froehlich, J. C., Ison, J. R., Pellegrino, L. J., Phillips, D. S., . . . Williams, V. N. (1985). Genetic differences in avoidance learning by *rattus norvegicus*: Escape/avoidance responding, sensitivity to electric shock, discrimination learning, and open-field behavior. *Journal of Comparative Psychology*, 99(1), 60-73.
- Bunzow, J. R., Sonders, M. S., Arttamangkul, S., Harrison, L. M., Zhang, G., Quigley, D. I., . . . Kennedy, J. L. (2001). Amphetamine, 3, 4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamide, and

- metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor. *Molecular Pharmacology*, 60(6), 1181-1188.
- Burrows, H. L., Nakajima, M., Lesh, J. S., Goosens, K. A., Samuelson, L. C., Inui, A., . . . Seasholtz, A. F. (1998). Excess corticotropin releasing hormone-binding protein in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in transgenic mice. *Journal of Clinical Investigation*, 101(7), 1439.
- Cain, C. K., & LeDoux, J. E. (2008). Emotional processing and motivation: In search of brain mechanisms. *Handbook of Approach and Avoidance Motivation*, 17-34.
- Cáñido, A., Maldonado, A., Megias, J. L., & Catena, A. (1992). Successive negative contrast in one-way avoidance learning in rats. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B*, 45(1), 15-32.
- Cañamero, L. (2005). Emotion understanding from the perspective of autonomous robots research. *Neural Networks*, 18(4), 445-455.
- Cañete, T., Guitart-Masip, M., Fernández-Teruel, A., Tobeña, A., & Giménez-Llort, L. (2003). Apomorphine and amphetamine induce differential activity patterns in roman high-and low-avoidance rats. *Acta Neurobiology Experimental*, 63, 55.
- Capitanio, J. P., Mendoza, S. P., & Baroncelli, S. (1999). The relationship of personality dimensions in adult male rhesus macaques to progression of simian immunodeficiency virus disease. *Brain, Behavior, and Immunity*, 13(2), 138-154.

- Cárdenas, J. (2002). Modelos animales de ansiedad incondicionada (I). *Psiquiatría Biológica*, 9(01), 18.
- Cárdenas, J., & Navarro, J. (2005). Modelos animales de ansiedad condicionada (II). *Revista De Psiquiatría y Salud Mental*, 216, 34-90.
- Carpi, A., Guerrero, C., & Palmero, F. (2008). Emociones básicas. In F. Palmero, & M. Martínez (Eds.), *Motivación y emoción* (pp. 233-274)
- Carrasco, J., Márquez, C., Nadal, R., Tobeña, A., Fernández-Teruel, A., & Armario, A. (2008). Characterization of central and peripheral components of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in the inbred roman rat strains. *Psychoneuroendocrinology*, 33(4), 437-445.
- Castanon, N., Dulluc, J., Le Moal, M., & Mormède, P. (1992). Prolactin as a link between behavioral and immune differences between the roman rat lines. *Physiology & Behavior*, 51(6), 1235-1241.
- Castanon, N., Perez-Diaz, F., & Mormède, P. (1995). Genetic analysis of the relationships between behavioral and neuroendocrine traits in roman high and low avoidance rat lines. *Behavior Genetics*, 25(4), 371-384.
- Cavallaro, S., D'Agata, V., Manickam, P., Dufour, F., & Alkon, D. L. (2002). Memory-specific temporal profiles of gene expression in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 16279-16284.
- Churchill, G. A. (2002). Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nature Genetics*, 32, 490-495.

- Claes, S., Villafuerte, S., Forsgren, T., Sluijs, S., Del-Favero, J., Adolfsson, R., & Van Broeckhoven, C. (2003). The corticotropin-releasing hormone binding protein is associated with major depression in a population from northern sweden. *Biological Psychiatry*, *54*(9), 867-872.
- Clore, G. L., & Ortony, A. (2000). Cognition in emotion: Always, sometimes, or never. In R. D. Lane, & L. Nadel (Eds.), *Cognitive neuroscience of emotion* (pp. 24-61) New York: Oxford University Press.
- Conroy, J. L., Fang, C., Gu, J., Zeitlin, S. O., Yang, W., Yang, J., . . . Mazurkiewicz, J. E. (2010). Opioids activate brain analgesic circuits through cytochrome P450/epoxygenase signaling. *Nature Neuroscience*, *13*(3), 284-286.
- Coppens, C. M., de Boer, S. F., Steimer, T., & Koolhaas, J. M. (2013). Correlated behavioral traits in rats of the roman selection lines. *Behavior Genetics*, *43*(3): 220-226.
- Cordeiro, M. G., Lecca, D., Piras, G., Di Chiara, G., & Giorgi, O. (1997). Biochemical parameters of dopaminergic and GABAergic neurotransmission in the CNS of roman high-avoidance and roman low-avoidance rats. *Behavior Genetics*, *27*(6), 527-536.
- Cordeiro, M. G., Piras, G., Lecca, D., Fernández-Teruel, A., Driscoll, P., & Giorgi, O. (2005). The psychogenetically selected roman rat lines differ in the susceptibility to develop amphetamine sensitization. *Behavioural Brain Research*, *157*(1), 147.
- Cordeiro, M., Lecca, D., Piras, G., Viola, H., Medina, J., & Giorgi, O. (2001). Voluntary ethanol intake activates the meso-accumbal dopaminergic

- transmission in the roman, high-voidance but not roman low-avoidance rats. *Journal of neurochemistry*, 78, 80.
- Crespi, L. P. (1942). Quantitative variation of incentive and performance in the white rat. *The American Journal of Psychology*, 55, 467-517.
- Cuenya, L., Fosachecha, S., Mustaca, A., & Kamenetzky, G. (2011). Efectos del aislamiento en la adultez sobre el dolor y la frustración. *Psicológica: Revista De Metodología y Psicología Experimental*, 32(1), 49-63.
- Cuenya, L., Gómez, M. J., Sabariego, M., Mustaca, A. E., & Torres, C. (2011). Relatividad de los incentivos: Aportes de los estudios con líneas endocriadas. In M. C. Richaud, & V. Lemos (Eds.), *Psicología y otras ciencias del comportamiento. compendio de investigaciones actuales. vol 1*. (Buenos Aires: CIIPME-CONICET ed.)
- Cuenya, L., Kamenetzky, G. V., & Mustaca, A. E. (2008). Dimensiones temperamentales en roedores: Aspectos metodológicos y conceptuales. In M. C. Richaud, & J. E. Moreno (Eds.), *Investigación en ciencias del comportamiento. avances iberoamericanos* (Buenos Aires: CIIPME – CONICET. ed.,)
- Cuenya, L., Sabariego, M., Martínez, A. L., Fernández-Teruel, A., Mustaca, A., & Torres, C. (2010). *Caracterización conductual de las ratas romanas de alta y baja evitación en una batería de pruebas sobre actividad locomotora y búsqueda de novedad*. Póster presentado en el XXII Congreso de la Sociedad Española de Psicología Comparada (Almería, España).

- Dachowski, L., & Brazier, M. M. (1991). Consummatory incentive contrast: Experimental design relationships and deprivation effects. *Current Topics in Animal Learning: Brain, Emotion, and Cognition*, 245.
- D'Agata, V., & Cavallaro, S. (2003). Hippocampal gene expression profiles in passive avoidance conditioning. *European Journal of Neuroscience*, 18(10), 2835-2841.
- Daly, H. B. (1974). Reinforcing properties of escape from frustration aroused in various learning situations. . In G. W. Bower (Ed.), *The psychology of learning and Motivation. (vol. VIII)*. (pp. 187-231) New York: Academic Press.
- Damasio, A. (2007). *El error de descartes: La emoción, la razón y el cerebro humano*. Barcelona: Crítica.
- Damasio, A. R. (1998). Emotion in the perspective of an integrated nervous system. *Brain Research Reviews*. 26(2-3):83-6.
- D'Angio, M., Serrano, A., Driscoll, P., & Scatton, B. (1988). Stressful environmental stimuli increase extracellular DOPAC levels in the prefrontal cortex of hypoemotional (roman high-avoidance) but not hyperemotional (roman low-avoidance) rats. an in vivo voltammetric study. *Brain Research*, 451(1-2), 237-247.
- Dantzer, R. (1987). Behavioral analysis of anxiolytic drug action. In A. J. Greenshaw, & C. T. Dourish (Eds.), *Experimental psychopharmacology* (pp. 263-297). Clifton, N. J.: Human Press.

- Darwin, C. (1872). The expression of emotions in animals and man. *Nueva York: Appleton.*
- Davis, M. (1997). Neurobiology of fear responses. In S. Salloway, P. Malloy & J. Cummings: *The Neuropsychiatry of Limbic and Subcortical Disorders.* American Psychiatric Press.
- Dent, G. W., O'Dell, D. M., & Eberwine, J. H. (2001). Gene expression profiling in the amygdala: An approach to examine the molecular substrates of mammalian behavior. *Physiology & Behavior*, 73(5), 841-847.
- Di Chiara, G., & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(14), 5274-5278.
- Díaz-Morán, S., Martínez-Membrives, E., López-Aumatell, R., Cañete, T., Blázquez, G., Palencia, M., . . . Fernández-Teruel, A. (2013). What can we learn on rodent fearfulness/anxiety from the genetically heterogeneous NIH-HS rat stock? *Open Journal of Psychiatry*, 3, 238-250.
- Díaz-Morán, S., Palència, M., Mont-Cardona, C., Cañete, T., Blázquez, G., Martínez-Membrives, E., . . . Fernández-Teruel, A. (in press). Gene expression in amygdala as a function of differential trait anxiety levels in genetically heterogeneous NIH-HS rats. *Behavioral Brain Research.*
- Díaz-Morán, S., Palència, M., Mont-Cardona, C., Cañete, T., Blázquez, G., Martínez-Membrives, E., . . . Fernández-Teruel, A. (2012). Coping style

- and stress hormone responses in genetically heterogeneous rats: Comparison with the roman rat strains. *Behavioural Brain Research*, 228(1), 203-210.
- Do, J. H., & Choi, D. (2006). Normalization of *microarray* data: Single-labeled and dual-labeled arrays. *Molecules and Cells*, 22(3), 254.
- Domjan, M. (2006). *Principios de aprendizaje y conducta* Madrid: Thomson.
- Donaire, R., Sabariego, M., Cano, F. J., Márquez, I., Fernández-Teruel, A., & Torres, C. (2013). *Behavioral profile of roman high- (RHA-I) and low-avoidance (RLA-I) rats in the successive alley test for anxiety*. Poster presentado en el XXV Congreso de la Sociedad Española de Psicología Comparada, San Sebastián (Spain).
- Dopazo, J. (2006). Functional interpretation of *microarray* experiments. *Omics: A Journal of Integrative Biology*, 10(3), 398-410.
- Driscoll, P. (1986). Roman high-and low-avoidance rats: Present status of the swiss sublimes, RHA/Verh and RLA/Verh, and effects of amphetamine on shuttle-box performance. *Behavior Genetics*, 16(3), 355-364.
- Driscoll, P., & Bättig, K. (1982). *Behavioral, emotional and neurochemical profiles of rats selected for extreme differences in active, two-way avoidance performance*. Amsterdam: Elsevier.
- Driscoll, P., Dedek, J., D'Angio, M., Claustre, Y., & Scatton, B. (1990). A genetically-based model for divergent stress responses: Behavioral, neurochemical and hormonal aspects. *Fortschritte Der Tierzuechtung*

- Und Zuechtungsbiologie: Advances in animal breeding and genetics*. 5: 97-107.
- Driscoll, P., Dedek, J., Fuchs, A., & Gentsch, C. (1985). Stereotypic, hypothermic, and central dopaminergic effects of apomorphine in roman high-avoidance (RHA/Verh) and roman low-avoidance (RLA/Verh) rats. *Behavior Genetics*, 15, 591-592.
- Driscoll, P., Fernández-Teruel, A., Corda, M. G., Giorgi, O., & Steimer, T. (2009). Some guidelines for defining personality differences in rats. *Handbook of Behavior Genetics*, 281-300
- Dudoit, S., Shaffer, J. P., & Boldrick, J. C. (2003). Multiple hypothesis testing in *microarray* experiments. *Statistical Science*, 18(1): 71-103.
- Durcan, M. J., Wraight, K., & Fulker, D. W. (1984). The current status of two sublines of the roman high and low avoidance strains. *Behavior Genetics*, 14(6), 559-569.
- Earley, C., & Leonard, B. (1979). Consequences of reward and nonreward conditions: Runaway behavior, neurotransmitters and physiological indicators of stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 11(2), 215-219.
- Eede, F. V. D., Broeckhoven, C. V., & Claes, S. J. (2005). Corticotropin-releasing factor-binding protein, stress and major depression. *Ageing Research Reviews*, 4(2), 213-239.

- Eisenberger, N. I., Jarcho, J. M., Lieberman, M. D., & Naliboff, B. D. (2006). An experimental study of shared sensitivity to physical pain and social rejection. *Pain, 126*(1), 132-138.
- Eisenberger, N. I., Lieberman, M. D., & Williams, K. D. (2003). Does rejection hurt? an fMRI study of social exclusion. *Science, 302*(5643), 290-292.
- Ekman, P. (1999). Basic emotions. In T. Dalgleish, & M. Power (Eds.), *Handbook of Cognition and emotion* (pp. 45-60) Chichester: Wiley.
- Epstein, S. (1972). The nature of anxiety with emphasis upon its relationship to expectancy. In C. D. Spielberger (Ed.), *Anxiety: Current trends in theory and research* (pp. 291-337) New York: Academic Press.
- Escarabajal, M., Torres, C., & Flaherty, C. (2003). The phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze test is abolished by previous administration of chlordiazepoxide or buspirone. *Life Sciences, 73*(8), 1063-1074.
- Escorihuela, R. M., & Fernández-Teruel, A. (1998). Modelos animales en psicopatología y psicofarmacología: Del análisis experimental de la conducta a la neurogenética. *Psicología Conductual, 6*(1), 165-191.
- Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., Gil, L., Aguilar, R., Tobeña, A., & Driscoll, P. (1999). Inbred roman high- and low-avoidance rats: Differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviors. *Physiology & Behavior, 67*(1), 19-26.
- Escorihuela, R., Fernández-Teruel, A., Tobena, A., Langhans, W., Bättig, K., & Driscoll, P. (1997). Labyrinth exploration, emotional reactivity, and

- conditioned fear in young Roman/Verh inbred rats. *Behavior Genetics*, 27(6), 573-578.
- Esteban, F. J., Cano, C., & de la Haza, I. (2008). Análisis bioinformático de datos: Aplicación en *microarrays*. *Cuadernos De Medicina Reproductiva*, 14(1), 91.
- Eysenck, H. J., & Broadhurst, P. L. (1964). Experiments with animals: Introduction. In H. Eysenck (Ed.), *Experiments in motivation* (Elmsford, NY: Pergamon Press. ed., pp. 285-291)
- Fagni, L., Ango, F., Perroy, J., & Bockaert, J. (2004). Identification and functional roles of metabotropic glutamate receptor-interacting proteins. Paper presented at the *Seminars in Cell & Developmental Biology*, , 15(3) 289-298.
- Fattore, L., Fadda, P., & Fratta, W. (2009). Sex differences in the self-administration of cannabinoids and other drugs of abuse. *Psychoneuroendocrinology*, 34, S227-S236.
- Feldon, J., Rawlins, J., & Gray, J. (1985). Fornix-fimbria section and the partial reinforcement extinction effect. *Experimental Brain Research*, 58(3), 435-439.
- Fernández-Abascal, E. G. (2001). *Psicología general. Motivación y emoción*. Madrid: Editorial Centro de Estudios Ramón Areces.
- Fernández-Abascal, E. G., Martín, M. D., & Jiménez, M. P. (2003). Psicología de la emoción y la motivación.. En E. G. Fernández-Abascal, M. P.

- Jiménez & M. D. Martín (Eds.), *Emoción y motivación. la adaptación humana* (pp. 3-43) Madrid: Editorial Centro de Estudios Ramón Areces.
- Fernández-Teruel, A., Blazquez, G., Perez, M., Aguilar, R., Canete, T., Guitart, M., . . . Tobena, A. (2006). Latent inhibition threshold in roman high-avoidance rats: A psychogenetic model of abnormalities in attentional filter? [El umbral de inhibicion latente en las ratas romanas de alta evitacion: un modelo psicogenetico de anomalias en el filtraje atencional?] *Actas Espanolas De Psiquiatria*, 34(4), 257-263.
- Fernández-Teruel, A., Driscoll, P., Gil, L., Aguilar, R., Tobena, A., & Escorihuela, R. (2002). Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking, saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh and RLA/Verh) differing in incentive-seeking behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73(1), 225-231.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Castellano, B., González, B., & Tobeña, A. (1997). Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, Novelty/Reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: Focus on the roman rat lines. *Behavior Genetics*, 27(6), 513-526.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Gray, J. A., Aguilar, R., Gil, L., Giménez-Llort, L., . . . Flint, J. (2002). A quantitative trait locus influencing anxiety in the laboratory rat. *Genome Research*, 12(4), 618-626.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Núñez, J. F., Gomà, M., Driscoll, P., & Tobeña, A. (1992). Early stimulation effects on novelty-induced

- behavior in two psychogenetically-selected rat lines with divergent emotionality profiles. *Neuroscience Letters*, 137(2), 185-188.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R., Driscoll, P., Tobeña, A., & Bättig, K. (1994). Evaluating activity and emotional reactivity in a hexagonal tunnel maze: Correlational and factorial analysis from a study with the Roman/Verh rat lines. *Behavior Genetics*, 24(5), 419-425.
- Fernández-Teruel, A., Giménez-Llort, L., Escorihuela, R. M., Gil, L., Aguilar, R., Steimer, T., & Tobeña, A. (2002). Early-life handling stimulation and environmental enrichment: Are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73(1), 233-245.
- Ferré, P., Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Driscoll, P., Corda, M. G., Giorgi, O., & Tobeña, A. (1995). Behavior of the Roman/Verh high- and low-avoidance rat lines in anxiety tests: Relationship with defecation and self-grooming. *Physiology & Behavior*, 58(6), 1209-1213.
- Flaherty, C. F. (1985). *Animal learning and cognition*. Knopf :New York.
- Flaherty, C. F. (1991). Incentive contrast and selected animal models of anxiety. *Current Topics in Animal Learning: Brain, Emotion, and Cognition*, 207-243.
- Flaherty, C. F. (1996). *Incentive relativity*. New York: Cambridge University press.
- Flaherty, C. F., & Rowan, G. A. (1989). Rats (*rattus norvegicus*) selectively bred to differ in avoidance behavior also differ in response to novelty

- stress, in glycemic conditioning, and in reward contrast. *Behavioral and Neural Biology*, 51(2), 145-164.
- Flaherty, C. F., Coppotelli, C., Hsu, D., & Otto, T. (1998). Excitotoxic lesions of the hippocampus disrupt runway but not consummatory contrast. *Behavioural Brain Research*, 93(1-2), 1-9.
- Flint, J., & Shifman, S. (2008). Animal models of psychiatric disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18(3), 235-240.
- Franchina, J. J., & Brown, T. S. (1971). Reward magnitude shift effects in rats with hippocampal lesions. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 76(3), 365-370.
- Fuentes, A., Fresno, M. J., Santander, H., Valenzuela, S., Gutiérrez, M. F., & Miralles, R. (2010). Sensopercepción gustativa: Una revisión. *International Journal of Odontostomatology*, 4(2), 161-168.
- Fullerton, J. M., Willis-Owen, S. A., Yalcin, B., Shifman, S., Copley, R. R., Miller, S. R., . . . Mott, R. (2008). Human-mouse quantitative trait locus concordance and the dissection of a human neuroticism locus. *Biological Psychiatry*, 63(9), 874-883.
- Gavarini, S., Cayrol, C., Fuchs, T., Lyons, N., Ehrlich, M. E., Girard, J., & Ozelius, L. J. (2010). Direct interaction between causative genes of DYT1 and DYT6 primary dystonia. *Annals of Neurology*, 68(4), 549-553.
- Geller, I., & Seifter, J. (1960). The effects of meprobamate, barbiturates, d-amphetamine and promazine on experimentally induced conflict in the rat. *Psychopharmacologia*, 1(6), 482-492.

- Gellermann, L. W. (1933). Chance orders of alternating stimuli in visual discrimination experiments. *The Pedagogical Seminary and Journal of Genetic Psychology*, 42(1), 206-208.
- Gentsch, C., Lichtsteiner, M., Driscoll, P., & Feer, H. (1982). Differential hormonal and physiological responses to stress in roman high-and low-avoidance rats. *Physiology & Behavior*, 28(2), 259-263.
- Giménez-Llort, L., Masino, S. A., Diao, L., Fernández-Teruel, A., Tobeña, A., Halldner, L., & Fredholm, B. B. (2005). Mice lacking the adenosine A1 receptor have normal spatial learning and plasticity in the CA1 region of the hippocampus, but they habituate more slowly. *Synapse*, 57(1), 8-16.
- Giorgi, O., Corda, M. G., Carboni, G., Frau, V., Valentini, V., & Di Chiara, G. (1997). Effects of cocaine and morphine in rats from two psychogenetically selected lines: A behavioral and brain dialysis study. *Behavior Genetics*, 27(6), 537-546.
- Giorgi, O., Lecca, D., Piras, G., Driscoll, P., & Corda, M. (2003). Dissociation between mesocortical dopamine release and fear-related behaviours in two psychogenetically selected lines of rats that differ in coping strategies to aversive conditions. *European Journal of Neuroscience*, 17(12), 2716-2726.
- Giorgi, O., Orlandi, M., Escorihuela, R., Driscoll, P., Lecca, D., & Corda, M. (1994). GABAergic and dopaminergic transmission in the brain of roman high-avoidance and roman low-avoidance rats. *Brain Research*, 638(1), 133-138.

- Giorgi, O., Piras, G., & Corda, M. G. (2007). The psychogenetically selected roman high- and low-avoidance rat lines: A model to study the individual vulnerability to drug addiction. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *31*(1), 148-163.
- Giorgi, O., Piras, G., Lecca, D., & Corda, M. G. (2005). Differential activation of dopamine release in the nucleus accumbens core and shell after acute or repeated amphetamine injections: A comparative study in the roman high- and low-avoidance rat lines. *Neuroscience*, *135*(3), 987-998.
- Gómez, M. J., de la Torre, L., Callejas-Aguilera, J. E., Lerma-Cabrera, J. M., Rosas, J. M., Escarabajal, M. D., . . . Torres, C. (2008). The partial reinforcement extinction effect (PREE) in female roman high- (RHA-I) and low-avoidance (RLA-I) rats. *Behavioural Brain Research*, *194*(2), 187-192.
- Gómez, M. J., de la Torre, L., Callejas-Aguilera, J. E., Rosas, J. M., Escarabajal, M. D., Agüero, Á., . . . Torres, C. (2009). Differences in extinction of an appetitive instrumental response in female inbred roman high- (RHA-I) and low- (RLA-I) avoidance rats. *Psicológica*, *30*(2), 181-188.
- Gómez, M. J., Escarabajal, M. D., de la Torre, L., Tobeña, A., Fernández-Teruel, A., & Torres, C. (2009). Consummatory successive negative and anticipatory contrast effects in inbred roman rats. *Physiology & Behavior*, *97*(3-4), 374-380.
- Gómez, M. J., Morón, I., Torres, C., Esteban, F. J., de la Torre, L., Cándido, A., . . . Escarabajal, M. D. (2009). One-way avoidance acquisition and cellular

- density in the basolateral amygdala: Strain differences in roman high- and low-avoidance rats. *Neuroscience Letters*, 450(3), 317-320.
- Gosling, S. D., & Mollaghan, D. M. (2006). Animal research in social psychology: A bridge to functional genomics and other unique research opportunities. *Bridging Social Psychology: Benefits of Transdisciplinary Approaches*, 123-128.
- Gray, J. A. (1982). Précis of the neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septohippocampal system. *Behavioral and Brain Sciences*, 5, 469-534.
- Gray, J. A. (1987). *The psychology of fear and stress*. Cambridge University Press (Cambridge and New York).
- Gray, J. A., & McNaughton, N. (2000). *The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system* Oxford University Press, USA.
- Greenshaw, A. (1984). β -Phenylethylamine and reinforcement. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 8(4), 615-620.
- Griffith, L. C. (2004). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: An unforgettable kinase. *The Journal of Neuroscience*, 24(39), 8391-8393.
- Grigson, P. S., Spector, A. C., & Norgren, R. (1993). Microstructural analysis of successive negative contrast in free-feeding and deprived rats. *Physiology & Behavior*, 54(5), 909-916.

- Grigson, P. S., Spector, A. C., & Norgren, R. (1994). Lesions of the pontine parabrachial nuclei eliminate successive negative contrast effects in rats. *Behavioral Neuroscience*, *108*(4), 714.
- Guitart-Masip, M., Giménez-Llort, L., Fernández-Teruel, A., Canete, T., Tobena, A., Ögren, S. O., . . . Johansson, B. (2006). Reduced ethanol response in the alcohol-preferring RHA rats and neuropeptide mRNAs in relevant structures. *European Journal of Neuroscience*, *23*(2), 531-540.
- Guitart-Masip, M., Johansson, B., Cañete, T., Fernández-Teruel, A., Tobeña, A., Terenius, L., & Giménez-Llort, L. (2008). Regional adaptations in PSD-95, NGFI-A and secretogranin gene transcripts related to vulnerability to behavioral sensitization to amphetamine in the roman rat strains. *Neuroscience*, *151*(1), 195-208.
- Guitart-Masip, M., Johansson, B., Fernández-Teruel, A., Tobeña, A., & Giménez-Llort, L. (2008). Divergent effect of the selective D3 receptor agonist pd-128,907 on locomotor activity in roman high-and low-avoidance rats: Relationship to NGFI-A gene expression in the calleja islands. *Psychopharmacology*, *196*(1), 39-49.
- Hall, C. S. (1934). Emotional behavior in the rat. I. defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, *18*(3), 385-403.
- Hamer, D. (2002). Rethinking behavior genetics. *Science*, *298*(5591), 71-72.

- Hansen, C., & Spuhler, K. (1984). Development of the national institutes of health genetically heterogeneous rat stock. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 8(5), 477-479.
- Harada, K., Yamaji, T., & Matsuoka, N. (2008). Activation of the serotonin 5-HT 2C receptor is involved in the enhanced anxiety in rats after single-prolonged stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 89(1), 11-16.
- Haraguchi, S., Tsuda, M., Kitajima, S., Sasaoka, Y., Nomura-Kitabayashid, A., Kurokawa, K., & Saga, Y. (2003). nanos1: A mouse nanos gene expressed in the central nervous system is dispensable for normal development. *Mechanisms of Development*, 120(6), 721-731.
- Hardiman, G. (2004). *Microarray platforms-comparisons and contrasts. Pharmacogenomics*, 5(5), 487-502.
- Henke, P. G. (1973). Effects of reinforcement omission on rats with lesions in the amygdala. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 84(1), 187-193.
- Herringa, R. J., Nanda, S. A., Hsu, D. T., Roseboom, P. H., & Kalin, N. H. (2004). The effects of acute stress on the regulation of central and basolateral amygdala CRF-binding protein gene expression. *Molecular Brain Research*, 131(1), 17-25.
- Hommer, D. W., Skolnick, P., & Paul, S. M. (1987). The benzodiazepine/GABA receptor complex and anxiety. In H. Y. Meltzer (Ed.), *Psychopharmacology. the third generation of progress*. (pp. 977-983)

- Horio, N., Yoshida, R., Yasumatsu, K., Yanagawa, Y., Ishimaru, Y., & Matsunami, H. (2010). PKD2L1 is associated with the sour taste transduction. *Neuroscience Research*, *68*, 385.
- Hou, Y., Liu, Y., Kang, S., Yu, C., Chi, Z., & Liu, J. (2009). Glutamate receptors in the dorsal hippocampus mediate the acquisition, but not the expression, of conditioned place aversion induced by acute morphine withdrawal in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, *30*(10), 1385-1391.
- Imperato, A., & Di Chiara, G. (1986). Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *239*(1), 219-228.
- Irwin, L. N. (2001). Gene expression in the hippocampus of behaviorally stimulated rats: Analysis by DNA microarray. *Molecular Brain Research*, *96*(1), 163-169.
- Janssen, P. A., Leysen, J. E., Megens, A. A., & Awouters, F. H. (1999). Does phenylethylamine act as an endogenous amphetamine in some patients? *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, *2*(03), 229-240.
- Kabbaj, M., Devine, D., Savage, V., & Akil, H. (2000). Neurobiological correlates of individual differences in novelty-seeking behavior in the rat: Differential expression of stress-related molecules. *The Journal of Neuroscience*, *20*(18), 6983-6988.
- Kabbaj, M., Evans, S., Watson, S., & Akil, H. (2004). The search for the neurobiological basis of vulnerability to drug abuse: Using *microarrays*

- to investigate the role of stress and individual differences. *Neuropharmacology*, 47, 111-122.
- Kaiser, F. J., Osmanovic, A., Rakovic, A., Erogullari, A., Uflacker, N., Braunholz, D., . . . Gillessen-Kaesbach, G. (2010). The dystonia gene DYT1 is repressed by the transcription factor THAP1 (DYT6). *Annals of Neurology*, 68(4), 554-559.
- Kalueff, A., Wheaton, M., & Murphy, D. (2007). What's wrong with my mouse model?: Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. *Behavioural Brain Research*, 179(1), 1-18.
- Kamenetzky, G. V., Cuenya, L., Elgier, A. M., López Seal, F., Fosachecha, S., Martin, L., & Mustaca, A. E. (2009). Respuestas de frustración en humanos. *Terapia Psicológica*, 27, 191-201.
- Kamenetzky, G. V., Mustaca, A. E., & Papini, M. R. (2008). An analysis of the anxiolytic effects of ethanol on consummatory successive negative contrast. *Avances En Psicología Latinoamericana*, 26(2), 135-144.
- Kandel, E. R., & Kupfermann, I. (1997). Estados emocionales. En E. R. Kandel, Schwartz J. H. & T. M. Jessell (Eds.), *Neurociencia y conducta* (pp. 635-652)
- Karolyi, I. J., Burrows, H. L., Ramesh, T. M., Nakajima, M., Lesh, J. S., Seong, E., . . . Seasholtz, A. F. (1999). Altered anxiety and weight gain in corticotropin-releasing hormone-binding protein-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(20), 11595-11600.

- Kawasaki, K., & Iwasaki, T. (1997). Corticosterone levels during extinction of runway response in rats. *Life Sciences*, *61*(17), 1721-1728.
- Kleinginna, P. R., & Kleinginna, A. M. (1981). A categorized list of emotion definitions, with a suggestions for a consensual definition. *Motivation and Emotion*, *5*, 345-379.
- Klinger, E. (1975). Consequences of commitment to and disengagement from incentives. *Psychological Review*, *82*(1), 1-25.
- Koenen, K. C., Amstadter, A. B., & Nugent, N. R. (2009). Gene-environment interaction in posttraumatic stress disorder: An update. *Journal of Traumatic Stress*, *22*(5), 416-426.
- Kolb, B., & Whishaw, I. Q. (2006). *Neuropsicologia Humana/Fundamentals of Human Neuropsychology*. Ed. Médica Panamericana.
- Kusaga, A., Yamashita, Y., Koeda, T., Hiratani, M., Kaneko, M., Yamada, S., & Matsuishi, T. (2002). Increased urine phenylethylamine after methylphenidate treatment in children with ADHD. *Annals of Neurology*, *52*(3), 372-374.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., . . . FitzHugh, W. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, *409*(6822), 860-921.
- Lang, P. J. (1995). Lang, P. J. (1995). The emotion probe: Studies of motivation and attention. *American psychologist*, *50*(5), 372.

- Lang, P. J., Davis, M., & Öhman, A. (2000). Fear and anxiety: Animal models and human cognitive psychophysiology. *Journal of Affective Disorders*, 61(3), 137-159.
- Lapin, I. P. (1990). Beta-phenylethylamine (PEA): An endogenous anxiogen? Three series of experimental data. *Biological Psychiatry*, 28(11), 997-1003.
- Lecca, D., Piras, G., Driscoll, P., Giorgi, O., & Corda, M. G. (2004). A differential activation of dopamine output in the shell and core of the nucleus accumbens is associated with the motor responses to addictive drugs: A brain dialysis study in roman high- and low-avoidance rats. *Neuropharmacology*, 46(5), 688-699.
- LeDoux, J. (1997). The emotional brain: The mysterious underpinnings of emotional life. *WORLD AND I*, 12, 281-285.
- LeDoux, J. E. (1999). *El cerebro emocional*. Barcelona, Ed. Planeta.
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, 23(1), 155-184.
- LeDoux, J. (2007). The amygdala. *Current Biology*, 17(20), R868-R874
- Leslie, J. C., Shaw, D., McCabe, C., Reynolds, D. S., & Dawson, G. R. (2004). Effects of drugs that potentiate GABA on extinction of positively-reinforced operant behaviour. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(3), 229-238.

- Leszczuk, M. H., & Flaherty, C. F. (2000). Lesions of nucleus accumbens reduce instrumental but not consummatory negative contrast in rats. *Behavioural Brain Research*, 116(1), 61-79.
- Letwin, N. E., Kafkafi, N., Benjamini, Y., Mayo, C., Frank, B. C., Luu, T., . . . Elmer, G. I. (2006). Combined application of behavior genetics and *microarray* analysis to identify regional expression themes and gene-behavior associations. *The Journal of Neuroscience*, 26(20), 5277-5287.
- Levenson, J. M., Choi, S., Lee, S., Cao, Y. A., Ahn, H. J., Worley, K. C., . . . Sweatt, J. D. (2004). A bioinformatics analysis of memory consolidation reveals involvement of the transcription factor c-rel. *The Journal of Neuroscience*, 24(16), 3933-3943.
- Lewin, A. H. (2006). Receptors of mammalian trace amines. *The AAPS Journal*, 8(1), 138-145.
- Lin, J., Roman, C., & Reilly, S. (2009). Insular cortex and consummatory successive negative contrast in the rat. *Behavioral Neuroscience*, 123(4), 810.
- Lindemann, L., & Hoener, M. C. (2005). A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(5), 274-281.
- Lister, R. G. (1990). Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 46(3), 321-340.
- Lombardo, K. A., Herringa, R. J., Balachandran, J. S., Hsu, D. T., Bakshi, V. P., Roseboom, P. H., & Kalin, N. H. (2001). Effects of acute and repeated

- restraint stress on corticotropin-releasing hormone binding protein mRNA in rat amygdala and dorsal hippocampus. *Neuroscience Letters*, 302(2), 81-84.
- López-Aumatell, R., Blázquez, G., Gil, L., Aguilar, R., Cañete, T., Giménez-Llort, L., . . . Fernández-Teruel, A. (2009). The roman high-and-low-avoidance rat strains differ in fear potentiated startle and classical aversive conditioning. *Psicothema*, 21(1), 27-32.
- Lopez-Seal, M. F., Cuenya, L., Suarez, A. B., & Mustaca, A. E. (in press). Consummatory suppression due to incentive downshift is not a consequence of enhanced search behavior. *Behavioural Processes*.
- Lovejoy, D., Aubry, J., Turnbull, A., Sutton, S., Potter, E., Yehling, J., . . . Yale, W. (1998). Ectopic expression of the CRF-binding protein: Minor impact on HPA axis regulation but induction of sexually dimorphic weight gain. *Journal of Neuroendocrinology*, 10(7), 483-492.
- Luria, A., Morisseau, C., Tsai, H., Yang, J., Inceoglu, B., De Taeye, B., . . . Hammock, B. D. (2009). Alteration in plasma testosterone levels in male mice lacking soluble epoxide hydrolase. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297(2), 375-383.
- MacDonald, G., & Leary, M. R. (2005). Why does social exclusion hurt? the relationship between social and physical pain. *Psychological Bulletin*, 131(2), 202-223.
- Mackintosh, N. J. (1974). *The psychology of animal learning*. Academic Press.

- Manzo, L., Gómez, M. J., Callejas-Aguilera, J. E., Fernández-Teruel, A., Papini, M. R., & Torres, C. (2012). Oral ethanol self-administration in inbred roman high-and low-avoidance rats: Gradual versus abrupt ethanol presentation. *Physiology & Behavior, 108* (0), 1-5
- Marowsky, A., Burgener, J., Falck, J., Fritschy, J., & Arand, M. (2009). Distribution of soluble and microsomal epoxide hydrolase in the mouse brain and its contribution to cerebral epoxyeicosatrienoic acid metabolism. *Neuroscience, 163*(2), 646-661.
- Martin, J. R., & Bättig, K. (1980). Exploratory behaviour of rats at oestrus. *Animal Behaviour, 28*(3), 900-905.
- Martínez-Conejero, J. A., & Horcajadas, J. A. (2008). La tecnología de los *microarrays* en Medicina reproductiva. *CMR, 14*(51), 63.
- Martínez-Sánchez, F., Fernández-Abascal, E. G., & Palmero, F. (2002). El proceso emocional. In F. Palmero, E. G. Fernández-Abascal, F. Martínez-Sánchez & M. Chóliz (Eds.), *Psicología de la motivación y la emoción* (pp. 57-87) Madrid: McGraw-Hill.
- McCallion, A., Stewart, G., Montague, P., Griffiths, I., & Davies, R. (1999). Splicing pattern, transcript start distribution, and DNA sequence of the mouse gene (mobp) encoding myelin-associated oligodendrocytic basic protein. *Molecular and Cellular Neuroscience, 13*(4), 229-236.
- McClennen, S. J., Cortright, D. N., & Seasholtz, A. F. (1998). Regulation of pituitary corticotropin-releasing hormone-binding protein messenger ribonucleic acid levels by restraint stress and adrenalectomy. *Endocrinology, 139*(11), 4435-4441.

- McNaughton, C., & Zangrossi, J. (2008). Theoretical approaches to the modeling of anxiety in animals. In R. J. Blanchard, D. C. Blanchard, G. Griebel & D. Nutt (Eds.), *Handbook of anxiety and fear* (pp. 11-28) Amsterdam: Academic Press.
- McNaughton, N., & Corr, P. J. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: Fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(3), 285-305.
- Mehta, P. H., & Gosling, S. D. (2006). How can animal studies contribute to research on the biological bases of personality. *Biology of Personality and Individual Differences*, , 427-448.
- Mei, B., Li, C., Dong, S., Jiang, C. H., Wang, H., & Hu, Y. (2005). Distinct gene expression profiles in hippocampus and amygdala after fear conditioning. *Brain Research Bulletin*, 67(1), 1-12.
- Misawa, H., Kawasaki, Y., Mellor, J., Sweeney, N., Jo, K., Nicoll, R. A., & Brecht, D. S. (2001). Contrasting localizations of MALS/LIN-7 PDZ proteins in brain and molecular compensation in knockout mice. *Journal of Biological Chemistry*, 276(12), 9264-9272.
- Mitchell, C. P., & Flaherty, C. F. (2005). Differential effects of removing the glucose or saccharin components of a glucose-saccharin mixture in a successive negative contrast paradigm. *Physiology & Behavior*, 84(4), 579-583.
- Mitchell, C., & Flaherty, C. (1998). Temporal dynamics of corticosterone elevation in successive negative contrast. *Physiology & Behavior*, 64(3), 287-292.

- Morán, S. D., Palència, M., Cañete, T., Blázquez, G., Morón, I., Sabariego, M., . . . Martínez-Membrives, E. (2011). Aplicabilidad del análisis de *microarray* en la detección de patrones de expresión genética diferencial en procesos psicológicos: Expresión genética amigdalар en ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad. *Iniciación a La Investigación*, (6)
- Moreno, M., Cardona, D., Gomez, M. J., Sanchez-Santed, F., Tobena, A., Fernandez-Teruel, A., . . . Flores, P. (2010). Impulsivity characterization in the roman high- and low-avoidance rat strains: Behavioral and neurochemical differences. *Neuropsychopharmacology*, 35(5), 1198-1208.
- Morón, I., Gómez, M. J., Escarabajal, M. D., de la Torre, L., Cándido, A., Maldonado, A., . . . Torres, C. (2010). One-way avoidance learning in female inbred roman high- and low-avoidance rats: Effects of bilateral electrolytic central amygdala lesions. *Neuroscience Letters*, 474(1), 32-36.
- Murai, R., Noda, Y., Matsui, K., Kamei, H., Mouri, A., Matsuba, K., . . . Nabeshima, T. (2007). Hypofunctional glutamatergic neurotransmission in the prefrontal cortex is involved in the emotional deficit induced by repeated treatment with phencyclidine in mice: Implications for abnormalities of glutamate release and NMDA-CaMKII signaling. *Behavioural Brain Research*, 180(2), 152.
- Mustaca, A. E., & Papini, M. R. (2005). Consummatory successive negative contrast induces hypoalgesia. *International Journal of Comparative Psychology*, 18(4): 333-339.

- Mustaca, A. E., Bentosela, M., & Papini, M. R. (2000). Consummatory successive negative contrast in mice. *Learning and Motivation, 31*(3), 272-282.
- Norris, J. N., Daniel, A. M., & Papini, M. R. (2008). Spontaneous recovery of consummatory behavior, but not of consummatory successive negative contrast. *Learning and Motivation, 39*(4), 296-312.
- Onaka, T., Takayanagi, Y., & Leng, G. (2010). Metabolic and stress-related roles of prolactin-releasing peptide. *Trends in Endocrinology & Metabolism, 21*(5), 287-293.
- O'reilly, R. L., & Davis, B. A. (1994). Phenylethylamine and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 18*(1), 63-75.
- Ortega, L. A., Uhelski, M., Fuchs, P. N., & Papini, M. R. (2011). Impairment of recovery from incentive downshift after lesions of the anterior cingulate cortex: Emotional or cognitive deficits? *Behavioral Neuroscience, 125*(6), 988.
- Overmier, J. B. (2007). La investigación básica con animales fortalece la ciencia y la práctica de la psicología. *Interdisciplinaria, 24*(2), 211-228.
- Overstreet, D. H., Rezvani, A. H., & Janowsky, D. S. (1992). Maudsley reactive and nonreactive rats differ only in some tasks reflecting emotionality. *Physiology & Behavior, 52*(1), 149-152.
- Pan, Y., Liu, Y., Young, K. A., Zhang, Z., & Wang, Z. (2009). Post-weaning social isolation alters anxiety-related behavior and neurochemical gene

- expression in the brain of male prairie voles. *Neuroscience Letters*, 454(1), 67-71.
- Panksepp, J. (1981). The ontogeny of play in rats. *Developmental Psychobiology*, 14(4), 327-332.
- Panksepp, J. (2003). Can anthropomorphic analyses of separation cries in other animals inform us about the emotional nature of social loss in humans? *Psychological Review*, 110(2):376-88
- Panksepp, J. (2005a). Social support and pain: How does the brain feel the ache of a broken heart? *Journal of Cancer Pain & Symptom Palliation*, 1(1), 59-65.
- Panksepp, J. (2005b). Why does separation distress hurt? comment on MacDonald and leary (2005). *Psychological Bulletin*, 131(2), 224.
- Panksepp, J. (2011). The neurobiology of social loss in animals: Some keys to the puzzle of psychic pain in humans. In G. MacDonald & L.A. Jensen-Campbell, Lauri A. *Social pain: Neuropsychological and health implications of loss and exclusion*. American Psychological Association: Washington, DC.
- Papini, M. R. (2003). Comparative psychology of surprising nonreward. *Brain, Behavior and Evolution*, 62(2), 83-95.
- Papini, M. R. (2006). Role of surprising nonreward in associative learning. *Japanese Journal of Animal Psychology*, 56(1), 35-54.
- Papini, M. R. (2009). Role of opioid receptors in incentive contrast. *International Journal of Comparative Psychology*, 22(3), 170-187.

- Papini, M. R., & Dudley, R. T. (1997). Consequences of surprising reward omissions. *Review of General Psychology*, 1(2), 175-197.
- Papini, M. R., Wood, M., Daniel, A. M., & Norris, J. N. (2006). Reward loss as psychological pain. *International Journal of Psychology and Psychological Therapy*, 6(2), 189-213.
- Paradee, W., Melikian, H., Rasmussen, D., Kenneson, A., Conn, P., & Warren, S. (1999). Fragile X mouse: Strain effects of knockout phenotype and evidence suggesting deficient amygdala function. *Neuroscience*, 94(1), 185-192.
- Paulos, M. A., & Tessel, R. E. (1982). Excretion of beta-phenethylamine is elevated in humans after profound stress. *Science*, 215(4536), 1127-1129.
- Pawlak, C. R., Ho, Y., & Schwarting, R. K. (2008). Animal models of human psychopathology based on individual differences in novelty-seeking and anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(8), 1544-1568.
- Pecoraro, N., & Dallman, M. F. (2005). c-fos after incentive shifts: Expectancy, incredulity, and recovery. *Behavioral Neuroscience*, 119(2), 366-387.
- Pellegrini, S., & Mustaca, A. (2000). Consummatory successive negative contrast with solid food. *Learning and Motivation*, 31(2), 200-209.
- Pellegrini, S., Muzio, R. N., Mustaca, A. E., & Papini, M. R. (2004). Successive negative contrast after partial reinforcement in the consummatory behavior of rats. *Learning and Motivation*, 35(4), 303-321.

- Pellegrini, S., Wood, M., Daniel, A. M., & Papini, M. R. (2005). Opioid receptors modulate recovery from consummatory successive negative contrast. *Behavioural Brain Research*, 164(2), 239-249.
- Peng, X., Wood, C. L., Blalock, E. M., Chen, K. C., Landfield, P. W., & Stromberg, A. J. (2003). Statistical implications of pooling RNA samples for *microarray* experiments. *BMC Bioinformatics*, 4(1), 26.
- Peterson, D. A., Sejnowski, T. J., & Poizner, H. (2010). Convergent evidence for abnormal striatal synaptic plasticity in dystonia. *Neurobiology of Disease*, 37(3), 558-573.
- Piras, G., Giorgi, O., & Corda, M. G. (2010). Effects of antidepressants on the performance in the forced swim test of two psychogenetically selected lines of rats that differ in coping strategies to aversive conditions. *Psychopharmacology*, 211(4), 403-414.
- Plutchik, R., & Kellerman, H. (1980). *Theories of emotion. emotion: Theory, research, and experience, vol. I*. New York: Academic Press.
- Purves, D. (2007). Las emociones. In D. Purves, G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, W. C. Hall, A. S. LaMantia, J. O. McNamara & S. M. Williams (eds) *Neurociencia* (pp. 761-786). Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- R software (<http://www.r-project.org/>)
- Ramos, A. (2008). Animal models of anxiety: Do I need multiple tests? *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(10), 493-498.

- Rash, J. E., Yasumura, T., Dudek, F. E., & Nagy, J. I. (2001). Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *The Journal of Neuroscience*, 21(6), 1983-2000.
- Ratner, A., Yelvington, D. B., & Rosenthal, M. (1989). Prolactin and corticosterone response to repeated footshock stress in male rats. *Psychoneuroendocrinology*, 14(5), 393-396.
- Razafimanalina, R., Mormede, P., & Velley, L. (1996). Gustatory preference-aversion profiles for saccharin, quinine and alcohol in roman high-and low-avoidance lines. *Behavioural Pharmacology*, 7(1), 78-84.
- Reilly, S., & Trifunovic, R. (1999). Gustatory thalamus lesions eliminate successive negative contrast in rats. *Behavioral Neuroscience*, 113(6), 1242.
- Rentaría-Alcántara, M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. In L. E. Eguiarte, V. Souza & X. Aguirre (Eds.), *Ecología molecular* (Instituto Nacional de Ecología, Semarnat y Conabio. México ed., pp. 541-566)
- Ressler, K. J., Paschall, G., Zhou, X., & Davis, M. (2002). Regulation of synaptic plasticity genes during consolidation of fear conditioning. *The Journal of Neuroscience*, 22(18), 7892-7902.
- Reynolds, G. P. (1979). Phenylethylamine—a role in mental illness? *Trends in Neurosciences*, 2, 265-268.

- Robinson, G., & Ben-Shahar, Y. (2002). Social behavior and comparative genomics: New genes or new gene regulation? *Genes, Brain and Behavior*, 1(4), 197-203.
- Rodgers, R. (1997). Animal models of 'anxiety': Where next? *Behavioural Pharmacology*, 8(6-7), 477-496.
- Rodgers, R., Cao, B., Dalvi, A., & Holmes, A. (1997). Animal models of anxiety: An ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30, 289-304.
- Rodrigues, S. M., Farb, C. R., Bauer, E. P., LeDoux, J. E., & Schafe, G. E. (2004). Pavlovian fear conditioning regulates Thr286 autophosphorylation of Ca²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II at lateral amygdala synapses. *The Journal of Neuroscience*, 24(13), 3281-3288.
- Román, F., & Sánchez-Navarro, J. P. (2008). Neuropsicología de la emoción. In J. Tirapu, M. Ríos & F. Maestú (Eds.), *Manual de neuropsicología* (pp. 285-303)
- Romero, L. M., Levine, S., & Sapolsky, R. M. (1995). Adrenocorticotropin secretagog release: Stimulation by frustration and paradoxically by reward presentation. *Brain Research*, 676(1), 151-156.
- Rooszendaal, B., Wiersma, A., Driscoll, P., Koolhaas, J., & Bohus, B. (1992). Vasopressinergic modulation of stress responses in the central amygdala of the roman high-avoidance and low-avoidance rat. *Brain Research*, 596(1), 35-40.

- Rosas, J. M., Callejas-Aguilera, J. E., Escarabajal, M. D., Gómez, M. J., de la Torre, L., Agüero, Á., . . . Torres, C. (2007). Successive negative contrast effect in instrumental runway behaviour: A study with roman high- (RHA) and roman low- (RLA) avoidance rats. *Behavioural Brain Research, 185*(1), 1-8.
- Rosselló, J., & Revert, X. (2008). Modelos teóricos en el estudio científico de la emoción. In F. Palmero, & F. Martínez (Eds.), *Motivación y emoción* (pp. 95-137) Madrid: McGrawHill.
- Rowan, G. A., & Flaherty, C. F. (1991). Behavior of maudslay reactive and nonreactive rats (*rattus norvegicus*) in three consummatory contrast paradigms. *Journal of Comparative Psychology, 105*(2), 115-124.
- Sabariego, M., Gómez, M. J., Morón, I., Torres, C., Fernández-Teruel, A., Tobeña, A., . . . Esteban, F. J. (2011). Differential gene expression between inbred roman high- (RHA-I) and low- (RLA-I) avoidance rats. *Neuroscience Letters, 504*(3), 265-270.
- Sabelli, H., Mosnaim, A., & Vazquez, A. (1974). Phenylethylamine: Possible role in depression and antidepressive drug action. *Neurohumoral coding of brain function* (pp. 331-357) Springer.
- Sallés, J., de Jesús, M. L., Goñi, O., Fernández-Teruel, A., Driscoll, P., Tobeña, A., & Escorihuela, R. M. (2001). Transmembrane signaling through phospholipase C in cortical and hippocampal membranes of psychogenetically selected rat lines. *Psychopharmacology, 154*(2), 115-125.

- Sandín, B., & Chorot, P. (1995). Concepto y categorización de los trastornos de ansiedad. In A. Belloch, B. Sandín & F. Ramos (Eds.), *Manual de Psicopatología Vol. 2*(pp. 53-83) Madrid: McGraw-Hill.
- Sapolsky, R. M. (1994). The physiological relevance of glucocorticoid endangerment of the hippocampus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 746(1), 294-304.
- Sastre, A., & Reilly, S. (2006). Excitotoxic lesions of the gustatory thalamus eliminate consummatory but not instrumental successive negative contrast in rats. *Behavioural Brain Research*, 170(1), 34-40.
- Schmidt, M. V., & Müller, M. B. (2007). Animal models of anxiety. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 3(4), 369-374.
- Seasholtz, T. M., Zhang, T., Morissette, M. R., Howes, A. L., Yang, A. H., & Brown, J. H. (2001). Increased expression and activity of RhoA are associated with increased DNA synthesis and reduced p27Kip1 expression in the vasculature of hypertensive rats. *Circulation Research*, 89(6), 488-495.
- Seidenbecher, T., Laxmi, T. R., Stork, O., & Pape, H. (2003). Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science*, 301(5634), 846-850.
- Seltmann, M., Horsch, M., Drobyshchev, A., Chen, Y., de Angelis, M. H., & Beckers, J. (2005). Assessment of a systematic expression profiling approach in ENU-induced mouse mutant lines. *Mammalian Genome*, 16(1), 1-10.

- Shannon, H. E., & Thompson, W. A. (1984). Behavior maintained under fixed-interval and second-order schedules by intravenous injections of endogenous noncatecholic phenylethylamines in dogs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *228*(3), 691-695.
- Sirri, A., Bianchi, V., Pelizzola, M., Mayhaus, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Toniolo, D., & D'Adamo, P. (2010). Temporal gene expression profile of the hippocampus following trace fear conditioning. *Brain Research*, *1308*, 14-23.
- Smoller, J. W., Paulus, M. P., Fagerness, J. A., Purcell, S., Yamaki, L. H., Hirshfeld-Becker, D., . . . Stein, M. B. (2008). Influence of RGS2 on anxiety-related temperament, personality, and brain function. *Archives of General Psychiatry*, *65*(3), 298.
- Spector, A. A. (2009). Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. *Journal of Lipid Research*, *50*(Supplement), S52-S56.
- Spisak, S., Tulassay, Z., Molnar, B., & Guttman, A. (2007). Protein microchips in biomedicine and biomarker discovery. *Electrophoresis*, *28*(23), 4261-4273.
- Steimer, T., & Driscoll, P. (2005). Inter-individual vs line/strain differences in psychogenetically selected roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: Neuroendocrine and behavioural aspects. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *29*(1), 99-112.
- Steimer, T., Escorihuela, R., Fernandez-Teruel, A., & Driscoll, P. (1998). Long-term behavioural and neuroendocrine changes in roman high-(RHA/Verh) and low-(RLA-verh) avoidance rats following neonatal

- handling. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 16(3), 165-174.
- Steimer, T., la Fleur, S., & Schulz, P. E. (1997). Neuroendocrine correlates of emotional reactivity and coping in male rats from the roman high (RHA/Verh)-and low (RLA/Verh)-avoidance lines. *Behavior Genetics*, 27(6), 503-512.
- Steinhoff, C., & Vingron, M. (2006). Normalization and quantification of differential expression in gene expression *microarrays*. *Briefings in Bioinformatics*, 7(2), 166-177.
- Szabo, A., Billett, E., & Turner, J. (2001). Phenylethylamine, a possible link to the antidepressant effects of exercise? *British Journal of Sports Medicine*, 35(5), 342-343.
- Szumliński, K. K., Ary, A. W., & Lominac, K. D. (2008). Homers regulate drug-induced neuroplasticity: Implications for addiction. *Biochemical Pharmacology*, 75(1), 112-133.
- Szumliński, K. K., Kalivas, P. W., & Worley, P. F. (2006). Homer proteins: Implications for neuropsychiatric disorders. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(3), 251-257.
- Taylor, J. G., & Fragopanagos, N. F. (2005). The interaction of attention and emotion. *Neural Networks*, 18(4), 353-369.
- Taylor, J., Scherer, K., & Cowie, R. (2005). Introduction: 'emotion and brain: Understanding emotions and modelling their recognition'. *Neural Networks*, 18(4), 313-316.

- Telner, J. I., Merali, Z., & Singhal, R. L. (1982). Stress controllability and plasma prolactin levels in the rat. *Psychoneuroendocrinology*, 7(4), 361-364.
- Thierry, S., & Peter, D. (2003). Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: Behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress*, 6(2), 87-100.
- Thomas, B. L., & Papini, M. R. (2003). Mechanisms of spaced-trial runway extinction in pigeons. *Learning and Motivation*, 34(1), 104-126.
- Tobeña, A., & Fernández-Teruel, A. (2009). Modelos animales en psiquiatría. In C. Torres, M. D. Escarabajal, A. Cándido, L. de la Torre, M. J. Gómez & A. Maldonado (Eds.), *Tratado de psiquiatría. (vol. I) (2ª ed.,)* Ars Médica.
- Torres, C., Cándido, A., Escarabajal, M. D., de la Torre, L., Maldonado, A., Tobeña, A., & Fernández-Teruel, A. (2005). Successive negative contrast in one-way avoidance learning in female roman rats. *Physiology & Behavior*, 85(4), 377-382.
- Torres, C., Escarabajal, M. D., Cándido, A., de la Torre, L., Gómez, M. J., Maldonado, A., . . . Fernández-Teruel, A. (2007). One-way avoidance learning and diazepam in female roman high-avoidance and low-avoidance rats. *Behavioural Pharmacology*, 18(3), 251-253.
- Van der Heyden, J., & Bradford, L. (1988). A rapidly acquired one-way conditioned avoidance procedure in rats as a primary screening test

- for antipsychotics: Influence of shock intensity on avoidance performance. *Behavioural Brain Research*, 31(1), 61-67.
- Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2008). Social interactions in adolescent and adult Sprague-Dawley rats: Impact of social deprivation and test context familiarity. *Behavioural Brain Research*, 188(2), 398-405.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., . . . Holt, R. A. (2001). The sequence of the human genome. *Science Signaling*, 291(5507), 1304.
- Wang, H., Zhu, Y., Wong, P., Farook, J., Teo, A., Lee, L., & Moochhala, S. (2003). cDNA *microarray* analysis of gene expression in anxious PVG and SD rats after cat-freezing test. *Experimental Brain Research*, 149(4), 413-421.
- Wayman, G. A., Lee, Y., Tokumitsu, H., Silva, A., & Soderling, T. R. (2008). Calmodulin-kinases: Modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron*, 59(6), 914-931.
- Whitfield, C. W., Cziko, A., & Robinson, G. E. (2003). Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. *Science*, 302(5643), 296-299.
- Willis-Owen, S. A., & Flint, J. (2007). Identifying the genetic determinants of emotionality in humans; insights from rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 31(1), 115-124.

- Xie, Z., & Miller, G. M. (2009). Trace amine-associated receptor 1 as a monoaminergic modulator in brain. *Biochemical Pharmacology*, *78*(9), 1095-1104.
- Yalcin, B., Willis-Owen, S. A., Fullerton, J., Meesaq, A., Deacon, R. M., Rawlins, J. N. P., . . . Mott, R. (2004). Genetic dissection of a behavioral quantitative trait locus shows that Rgs2 modulates anxiety in mice. *Nature Genetics*, *36*(11), 1197-1202.
- Yelvington, D. B., Weiss, G. K., & Ratner, A. (1984). Effect of corticosterone on the prolactin response to psychological and physical stress in rats. *Life Sciences*, *35*(16), 1705-1711.
- Yelvington, D. B., Weiss, G. K., & Ratner, A. (1985). Habituation of the prolactin response in rats to psychological stress. *Psychoneuroendocrinology*, *10*(1), 95-102.
- Yokoi, F., Dang, M. T., Miller, C. A., Marshall, A. G., Campbell, S. L., Sweatt, J. D., & Li, Y. (2009). Increased c-fos expression in the central nucleus of the amygdala and enhancement of cued fear memory in Dyt1 Δ GAG knock-in mice. *Neuroscience Research*, *65*(3), 228-235.
- Yool, D., Klugmann, M., McLaughlin, M., Vouyiouklis, D., Dimou, L., Barrie, J., . . . Griffiths, I. (2001). Myelin proteolipid proteins promote the interaction of oligodendrocytes and axons. *Journal of Neuroscience Research*, *63*(2), 151-164.
- Zeier, H., Baettig, K., & Driscoll, P. (1978). Acquisition of DRL-20 behavior in male and female, roman high-and low-avoidance rats. *Physiology & Behavior*, *20*(6), 791-793.

Zhang, S., Amstein, T., Shen, J., Brush, F., & Gershenfeld, H. (2005). Molecular correlates of emotional learning using genetically selected rat lines. *Genes, Brain and Behavior*, 4(2), 99-109.

11. ANEXOS: ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Anexo I: Cuenya, L., Gómez, M.J., Sabariego, M., Mustaca, A.E. y Torres, C. (2011). *Relatividad de los Incentivos: Aportes de los Estudios con Líneas Endocriadas*. En: *Psicología y Otras Ciencias del Comportamiento. Compendio de Investigaciones Actuales*. Comp. María Cristina Richaud y Viviana Lemos. Buenos Aires: CIIPME-CONICET. Vol 1. 593-616. ISBN 978-987-1378-20-3

Anexo II: Cuenya, L., Sabariego, M., Donaire, R., Fernández-Teruel, A., Tobeña, A., Gómez, M.J., Mustaca, A., Torres, C. (2012). *The effect of Partial Reinforcement on Instrumental Successive Negative Contrast in inbred Roman High- (RHA-I) and Low-(RLA-I) Avoidance Rats*. *Physiology & Behavior*, 105, 1112-1116.

Anexo III: Sabariego, M., Gómez, M.J., Morón, I., Torres, C., Fernández-Teruel, A., Tobeña, A., Cañete, T., Martínez-Conejero, J.A., Horcajadas, J.A., Esteban, F.J. (2011). *Differential gene expression between inbred Roman High- (RHA-I) and Low-(RLA-I) Avoidance rats*. *Neuroscience Letters*, 504, 265-270.

Anexo IV: Sabariego, M., Morón, I., Gómez, M.J., Donaire, R., Tobeña, A., Fernández-Teruel, A., Martínez-Conejero, J.A., Esteban, F.J., Torres, C. (submitted). *Incentive loss and hippocampal gene expression in inbred Roman high- (RHA-I) and romanlow- (RLA-I) avoidance rats*. Enviado a *Behavioural Brain Research*.

ANEXO I

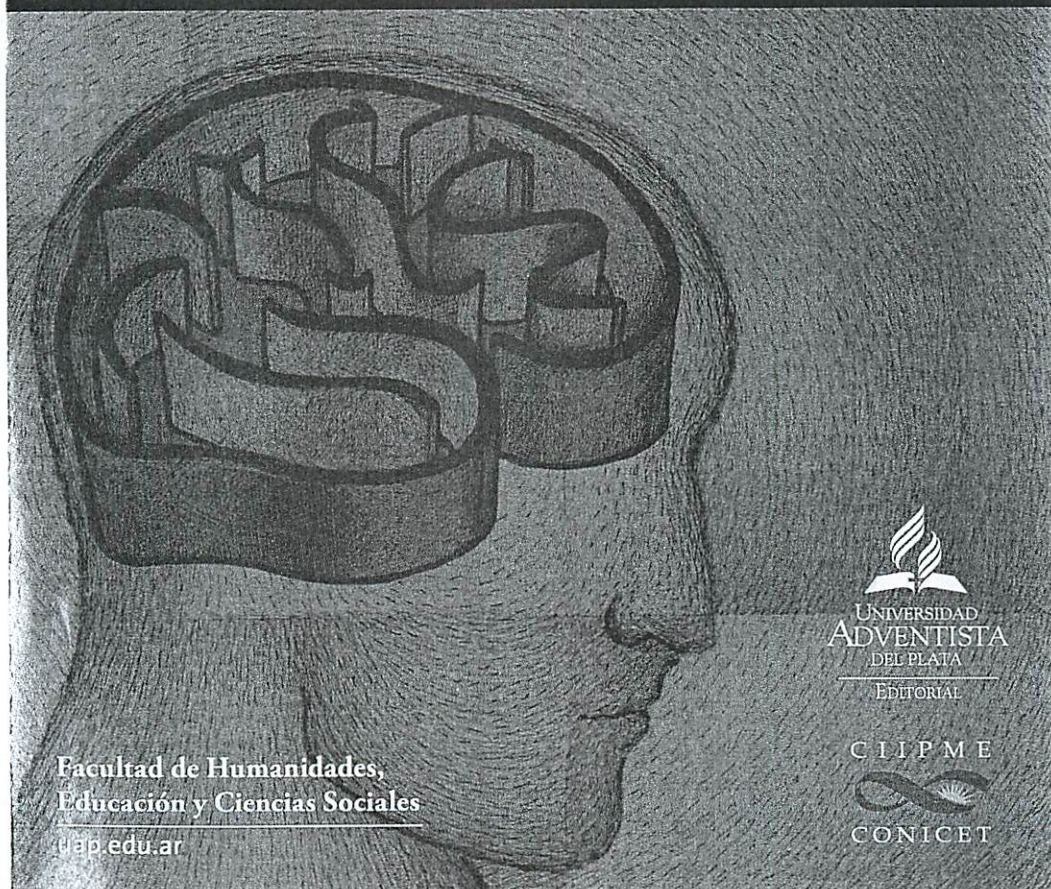
Cuenya, L., Gómez, M.J., Sabariego, M., Mustaca, A.E. y Torres, C. (2011). Relatividad de los Incentivos: Aportes de los Estudios con Líneas Endocriadas. En: Psicología y Otras Ciencias del Comportamiento. Compendio de Investigaciones Actuales. Comp. María Cristina Richaud y Viviana Lemos. Buenos Aires: CIIPME-CONICET. Vol 1. 593-616.

ISBN 978-987-1378-20-3

Volúmen II

PSICOLOGÍA
Y OTRAS CIENCIAS DEL COMPORTAMIENTO
Compendio de investigaciones actuales

|| **María Cristina Richaud y Viviana Lemos, compiladoras**



Facultad de Humanidades,
Educación y Ciencias Sociales
uap.edu.ar


UNIVERSIDAD
ADVENTISTA
DEL PLATA
EDITORIAL

CIIPME

CONICET

**PSICOLOGÍA Y OTRAS CIENCIAS DEL
COMPORTAMIENTO**

COMPENDIO DE INVESTIGACIONES ACTUALES

MARÍA CRISTINA RICHAUD DE MINZI

VIVIANA LEMOS DE CIUFFARDI



**EDITORIAL UNIVERSIDAD ADVENTISTA DEL PLATA
LIBERTADOR SAN MARTÍN, ENTRE RÍOS,
ARGENTINA**



**C I I P M E
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIONES
EN PSICOLOGÍA MATEMÁTICA Y EXPERIMENTAL
CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES**

PSICOLOGÍA Y OTRAS

CIENCIAS DEL

COMPORTAMIENTO

COMPENDIO DE

INVESTIGACIONES

ACTUALES

VOLUMEN II

Título original: *Psicología y otras Ciencias del Comportamiento. Compendio de investigaciones actuales*

Copyright © Editorial Universidad Adventista del Plata (2011)

Edición: Edith Soriano de Castro, Secretaría de Ciencia y Técnica, Universidad Adventista del Plata

Diseño de tapa: Verónica Bottari, Productus Estudio de Diseño

Psicología y otras ciencias del comportamiento: compendio de investigaciones actuales /

compilado por Viviana Lemos y María Cristina Richaud. - 1a ed. - Libertador San Martín: Universidad Adventista del Plata; Buenos Aires: Consejo Nacional Investigaciones Científicas Técnicas - CONICET, 2011.

v. 2, 445 p.; 23x15 cm.

ISBN 978-987-1378-21-0

1. Psicología - Ciencias del Comportamiento - Investigaciones. I. Lemos, Viviana, comp. II. Richaud, María Cristina, comp.
CDD 150

FECHA DE CATALOGACIÓN: 978-987-1378-21-0

ISBN: 21/07/2011



EDITORIAL UNIVERSIDAD ADVENTISTA DEL PLATA

25 DE MAYO 99, LIBERTADOR SAN MARTÍN,

E3103XAC ENTRE RÍOS, ARGENTINA

TELÉFONO: 54 343 4918000, INT. 1230 - FAX: 54 343 4918001

E-MAIL: SECINVES@UAP.EDU.AR

WEB SITE: WWW.UAP.EDU.AR

C I I P M E



CONICET

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIONES EN

PSICOLOGÍA MATEMÁTICA Y EXPERIMENTAL CONSEJO

NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS

JUAN D. PERÓN 2158, BUENOS AIRES, ARGENTINA

E-MAIL: CIIPME@SSDNET.COM.AR

WEB SITE: WWW.CONICET.GOV.AR

Se terminó de imprimir el 20 de julio de 2011 en Docuprint, Ruta Panamericana Km 37, 5, Calle Haendel, Lote 3, Parque Industrial Garín, Buenos Aires, Argentina.

Prohibida la reproducción total o parcial de esta publicación (texto, imágenes y diseño), su manipulación informática y transmisión ya sea electrónica, mecánica, por fotocopia u otros medios, sin permiso previo del editor.

IV. NEUROPSICOLOGÍA, PSICOBIOLOGÍA E INVESTIGACIONES SENSORIALES

RELATIVIDAD DE LOS INCENTIVOS: APORTES DE LOS ESTUDIOS CON LÍNEAS ENDOCRIADAS

LUCAS CUENYA, MARÍA JOSÉ GÓMEZ, MARTA SABARIEGO,
ALBA ELIZABETH MUSTACA Y CARMEN TORRES

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la vida, las personas deben enfrentar una multitud de situaciones y experiencias vitales que implican cambios repentinos en las recompensas esperadas, lo que puede provocar emociones tanto positivas como negativas. La muerte del cónyuge, la separación conyugal, un período de encarcelamiento o la muerte de uno de los miembros de la familia se encuentran entre los diez primeros sucesos vitales más estresantes (Scully, Tosi & Banning, 2000). Estas experiencias comparten una característica común, y es que se pierden o disminuyen eventos que producían alegría o placer, lo que en lenguaje técnico son reforzadores apetitivos. Esta situación obliga a poner en marcha estrategias de adaptación que pueden interferir con el funcionamiento psicológico, inmunológico, fisiológico y autonómico del individuo (Kamenetzky et al., 2009; Papini, 2003; Papini, Wood, Daniel & Norris, 2006). Las investigaciones realizadas con animales no humanos constituyen una valiosa herramienta para manipular sistemáticamente los parámetros implicados en situaciones de cambio de recompensa, facilitando una mejor comprensión de la relación existente entre esos factores, aunque sin abarcar la complejidad del comportamiento humano (Mustaca & Kamenetzky, 2006).

Una de las ventajas de la utilización de animales es la posibilidad de emplear y comparar cepas endocriadas por cruzamiento selectivo o selección psicogenética, también llamadas *líneas consanguíneas* o *endogámicas* (véase Cuenya, Kamenetzky & Mustaca, 2008). Por selección psicogenética se entiende realizar apareamientos entre animales en función de una o varias clases de respuestas en pruebas comportamentales. Este proceso tiene como resultado si el comportamiento elegido está en parte determinado por facto-

res genéticos, la creación de líneas o cepas que muestran patrones de comportamiento consistentes y usualmente divergentes a lo largo de las generaciones. Estos cruzamientos posibilitan el estudio de cepas de animales que expresan conductas extremas en una dimensión temperamental dada, y también aportan una evidencia presuntiva de que la conducta en cuestión se encontraría en alguna medida determinada genéticamente. El proceso de selección psicogenética también puede alterar características fisiológicas de los animales, principalmente aquellas que se encuentran íntimamente asociadas con las respuestas conductuales seleccionadas, por lo que resulta ser una valiosa herramienta para el estudio de las bases neurobiológicas del temperamento, y sus implicancias para la salud y la enfermedad (Steimer & Driscoll, 2005).

A pesar de que la selección psicogenética es un procedimiento relativamente costoso y extenso, debido a que requiere del cruzamiento selectivo de varias generaciones, no sólo permite estudiar las bases genéticas del comportamiento, sino también las posibles interacciones entre genotipo y ambiente, por ejemplo, a través de métodos por cría cruzada, permitiendo dilucidar qué aspectos del fenotipo son atribuibles exclusivamente a la influencia genética y cuáles a la interacción entre los mismos y el modo de cría materno (véase Broadhurst, 1969).

En el caso del presente estudio, otorga la posibilidad de indagar sobre la implicancia de los componentes emocionales en distintos paradigmas experimentales que evalúan las respuestas de los animales ante el cambio del refuerzo, al comparar ratas psicogenéticamente seleccionados en función de su reactividad emocional.

Los efectos *paradójicos del reforzamiento* comprenden una serie de fenómenos que involucran una pérdida o ganancia abrupta de la respuesta ante el cambio inesperado en la cantidad o calidad del refuerzo recibido, lo cual permite estudiar los mecanismos que determinan el ajuste del organismo ante situaciones de incertidumbre (Ortega & Papini, 2007). Estos fenómenos reciben esta denominación porque no pueden ser explicados por las teorías clásicas del aprendizaje, las cuales predicen una relación unívoca entre el nivel de respuesta y la magnitud absoluta del reforzador recibido (Hull, 1943).

Algunos de los efectos paradójicos del reforzamiento más destacados son los siguientes: a) El *Efecto del Reforzamiento Parcial sobre la Extinción* (ERPE) consiste en la persistencia de la respuesta aprendida sin obtención de recompensas que se observa en sujetos que han sido sometidos previamente a entrenamientos con ensayos reforzados y no reforzados, en comparación con la tasa de extinción que aparece cuando los sujetos han recibido refor-

zamiento continuo (Papini, 2009). b) El *Contraste Sucesivo Negativo* (CSN) consiste en la reducción de la respuesta a un incentivo de baja magnitud cuando dicha respuesta fue previamente asociada con un incentivo de alta magnitud, en comparación con un grupo control que siempre fue reforzado con uno de baja magnitud (Amsel, 1992). c) El CSN también es sensible al *Efecto del Reforzamiento Parcial* (ERPC), que consiste en una atenuación del contraste negativo cuando los animales son entrenados previamente con ensayos reforzados y no reforzados, y son comparados con sujetos entrenados bajo un programa de reforzamiento continuo (Pellegrini, Muzio, Mustaca & Papini, 2004). d) El *Contraste Sucesivo Positivo* (CSP), en contraposición al CSN, consiste en el aumento significativo de la respuesta del grupo experimental como consecuencia del incremento inesperado en la magnitud del incentivo, cuando se compara con un grupo control que siempre recibió el refuerzo de alta magnitud (Flaherty, Becker & Checke, 1983).

Estos efectos se han estudiado a través de los cambios que se observan en la conducta del animal tras la experiencia con el reforzador. Cuando la respuesta a evaluar es el consumo del refuerzo, el procedimiento se denomina *consumatorio*. En cambio, cuando la variable de interés es la conducta anticipatoria que el animal realiza para la obtención del refuerzo, el procedimiento se denomina *instrumental*. En ambos tipos de procedimientos se manipula el acceso a reforzadores apetitivos (e.g., comida o soluciones azucaradas) o aversivos (e.g., choques eléctricos). Estos paradigmas experimentales se describirán más detalladamente en los apartados destinados para cada uno de ellos.

Un amplio cuerpo de evidencia experimental sugiere que los efectos mencionados se explican principalmente por factores emocionales o motivacionales que regulan la respuesta aprendida (e.g., frustración, euforia) (Amsel, 1992; Gray & McNaughton, 2000), aunque otras teorías proponen la coexistencia de factores emocionales y cognitivos (Flaherty, 1996).

Existen otros procedimientos experimentales, como el *Contraste Negativo Anticipatorio* (CNA) y el *Contraste Negativo Simultáneo* (CNS), que son dependientes de mecanismos asociativos y sensoriales respectivamente (Flaherty, 1996). El CNA se observa en la supresión del consumo de un reforzador de baja magnitud al cual el animal tiene acceso diario, cuando dicho refuerzo es seguido de la presentación inmediata de un reforzador de alta magnitud (Flaherty & Mitchell, 1999). El CNS consiste en la exposición breve y alternante de reforzadores de alta y baja magnitud, y el efecto de contraste se expresa en una exagerada preferencia por refuerzo de alta magnitud cuando ambos reforzadores se presentan simultáneamente en una misma sesión (Reilly & Pritchard, 1997).

En este capítulo se revisarán los aportes que brindaron los estudios comparativos de cepas endocriadas por selección psicogénica a la discusión teórica sobre los mecanismos implicados en los fenómenos paradójicos del reforzamiento. La mayor parte de las investigaciones se realizaron comparando líneas de ratas seleccionadas por alguna característica diferencial expresada en alguna prueba de emocionalidad, para luego estudiarlas en los efectos de contraste. En un solo caso se estudiaron ratas seleccionadas en función de la respuesta en un contraste sucesivo negativo consumidor (CSNc) (Flaherty, Krauss, Rowan & Grigson, 1994) para luego estudiarlas en otros comportamientos.

La Tabla 1 presentará los principales resultados y características metodológicas de los estudios sobre efectos paradójicos en ratas endocriadas.

Nota. VD: Variable dependiente. CDP: Clorhidroóxido. CSNc: contraste sucesivo negativo consumidor. CSNi: contraste sucesivo negativo instrumental. CNAc: contraste negativo anticipatorio consumidor. ERP-CSNc: Efecto del reforzamiento parcial sobre el contraste sucesivo negativo consumidor. ERP-CSNi: Efecto del reforzamiento parcial sobre el contraste sucesivo negativo instrumental. Ei: Extinción instrumental. ERP-Ei: Efecto de reforzamiento parcial sobre la extinción consumidora. No se reportan estudios realizados hasta la fecha.

Procedimiento	Romanas de Baja (RLA) y Alta Evitación (RHA)	Maudsley Reactivas (MR) y No Reactivas (MNR)	Lewis y Fisher 344	SHR (hipertensas) y WKY (Wistar Kioto)	Syracusas de Baja (SLA) y Alta Evitación (SHA)	Referencias
CSNc 32-4	VD: Consumo (ml). <i>Pre cambio:</i> Igual consumo de soluciones de 32% y 4%. RHA: más consumo del 32% que de 4%. Consumen más del 32% que las RLA. <i>Post cambio:</i> Igual en ambas cepas.	VD: lamidas. <i>Pre cambio:</i> MR: Adquisición más lenta, pero al final de la fase se igualan con las MNR. <i>Post cambio:</i> MR: menor CSNc en día 1 que las MNR, Sprague Dawley, SLA y SHA. MNR: contraste similar a las SHA y mayor que SLA y Sprague Dawley. CDP: Sin efecto en ninguna de las cepas.	VD: lamidas. <i>Pre cambio:</i> Lewis: Mayor consumo del 32 y del 4% que las Fisher 344. <i>Post cambio:</i> Lewis: CSNc más intenso que las Fisher. Lewis: Recuperación más lenta en comparación con las Fisher 344. CDP: efecto en las Fisher 344 en el segundo ensayo acelerando su recuperación, sin efecto en las Lewis.	VD: Tiempo de contacto con el bebedero. <i>Pre cambio:</i> SHR igual consumo que las WKY. <i>Post cambio:</i> SHR: CSNc más intenso y duradero que las WKY	VD: lamidas <i>Pre cambio:</i> igual consumo al 32%, SLA: menos consumo del 4%. <i>Post cambio:</i> SLA: Mayor CSNc CDP: sin efecto en las SLA; efecto sobre el segundo día en las SHA.	Gómez, Escarabajal, de la Torre, Tobeña, Fernández-Teruel, & Torres (2009). Rowan & Flaherty (1991). Freet, Tesche, Tompers, Riegel, & Grigson (2006). Bentosela & Mustaca (2005). Flaherty & Rowan (1989).
CSNc 22-4	VD: Consumo (ml). <i>Pre cambio:</i> RLA: igual consumo entre 22% y 4%. RHA: consumen más del 22% que del 4%. Mayor consumo general que las RLA. <i>Post cambio:</i> RLA y RHA Igual intensidad de CSNc. Recuperación más lenta de las RLA.					Gómez, Escarabajal, de la Torre, Tobeña, Fernández-Teruel, & Torres (2009).
ERP-CSNc 22-4	VD: Consumo (ml) <i>Pre cambio:</i> Igual consumo en ensayos reforzados y no reforzados entre cepas. <i>Post cambio:</i> CSNc dos días y ER-CSNc el primer día en ambas cepas.					Sabariago, Cuenya, Donaire, Rodríguez, Fernández-Teruel, Mustaca, & Torres (2010).

Procedimiento	Romanas de Baja (RLA) y Alta Evitación (RHA)	Maudsley Reactivas (MR) y No Reactivas (MNR)	Lewis y Fisher 344	SHR (hipertensas) y WKY (Wistar)	Syracusas de Baja (SLA) y Alta Evitación (SHA)	Referencias
CNAc	VD: Consumo (ml) 4% - 22% sacarosa Contraste anticipatorio en ambas cepas.	VD: lamidas 0.15 sacarina - 32% saca ros Contraste anticipatorio en ambas cepas.	VD: lamidas 0.15 sacarina - 32% sacarosa Lewis: presencia de contraste anticipatorio Fisher 344: ausencia de contraste anticipatorio.			Gómez, Escarabajal, de la Torre, Tobeña, Fernández-Teruel, & Torres (2009). Rowand & Flaherty (1991). Grigson & Freet (2000).
Contraste Simultáneo Positivo y Negativo consumidor		VD: lamidas MNR: Contraste positivo y pegativo más intenso en comparación con las MR.			Ausencia de contraste simultaneo negativo en ambas cepas Presencia de contraste simultaneo positivo en ambas cepas.	Flaherty & Rowan (1989).
CSN evitación en un sentido 30-1s	VD: N° de ensayos para alcanzar criterio. Pre cambio: Sin diferencias entre las cepas Post cambio. RLA: menor rendimiento, diferencia entre 30-1 y 1-1. RHA: No hay diferencias entre 30-1 y 1-1					Torres, Cándido, Escarabajal, de la Torre, Maldonado, Tobeña, & Fernández-Teruel (2005).
CSP evitación en un sentido 1-30 s	VD: latencia de escape. Pre cambio: RLA: mayor latencia al principio que las RHA, hasta que se igualan. Post cambio RLA: menos latencia 1-30 que sus controles 1-1. RHA: no hay diferencias entre los grupos (posible efecto suelo).					Maldonado, Torres, Escarabajal, Cándido, de la Torre, Gómez, Tobeña, & Fernández-Teruel (2007).
CSNi 12 - 1	VD: latencia de recorrido a caja meta (s) Pre cambio: RLA: mayor latencia que las RHA. Post cambio: RLA: mayor latencia que las RHA. Efecto de reforzamiento y CSNi en ambas cepas.	VD: latencia de recorrido a caja meta (seg) Pre cambio: MR: adquisición más lenta que las MNR. Post cambio: MR: Mayor efecto de CSNi que las MNR.				Rosas, Callejas-Aguilera, Escarabajal, Gómez, de la Torre, Agüero, Tobeña, Fernández-Teruel, & Torres (2007). Eysenck & Broadhurst (1964).

Procedimiento	Romanas de Baja (RLA) y Alta Evitación (RHA)	Maudsley Reactivas (MR) y No Reactivas (MNR)	Lewis y Fisher 344	SHR (hipertensas) y WKY (Wistar Kioto)	Syracusas de Baja (SLA) y Alta Evitación (SHA)	Referencias
CSNi 12 - 2	VD: latencia de recorrido a caja meta (s). Pre cambio: RLA: mayor latencia al principio que las RHA, hasta que se igualan. Post cambio: RLA: mayor latencia que las RHA. Efecto de reforzamiento y CSN en las RLA, pero no en las RHA.					Rosas, Callejas-Aguilera, Escarabajal, Gómez, de la Torre, Agüero, Tobeña, Fernández-Teruel, & Torres (2007).
ERP-CSNi	VD: latencia de recorrido a caja meta (s). Pre cambio: RLA: mayor latencia al inicio que las RHA, hasta que se igualan. Post cambio: RLA: mayor latencia que las RHA., presencia de CSNi y ERP-CSNi. RHA: Ausencia de CSNi y ERP-CSNi					Sabariño, Cuenya, Donaire, Rodríguez, Fernández-Teruel, Mustata, & Torres (2010).
Ei	VD: latencia de recorrido a caja meta (s). Adquisición: RLA: más lentas en alcanzar el criterio que las RHA. Extinción: RLA: extinción más rápida (mayor latencia) que las RHA, pero igual que las Wistar.					Gómez, de la Torre, Callejas-Aguilera, Rosas, Escarabajal, Agüero, Tobeña, Fernández-Teruel, & Torres (2009).
ERP-Ei	VD: Latencia de recorrido a caja meta (s). Adquisición: RLA: más lenta que las RHA en ambos programas de reforzamiento. Extinción: RLA continuo extinguen más rápido que las parciales, hay ERPE. Menos resistencia a la extinción que las RHA cuando son continuas, pero no parciales. RHA: no hay ERPE, ni interacción entre sesión ni programa.					Gómez, de la Torre, Callejas-Aguilera, Lerma-Cabrera, Rosas, Escarabajal, Agüero, Tobeña, Fernández-Teruel, & Torres (2008).

PROCEDIMIENTOS CONSUMATORIOS

El *Contraste Sucesivo Negativo consumatorio* (CSNc) ha sido uno de los procedimientos más estudiados con líneas endocriadas. En el CSNc los animales tienen acceso, en ensayos diarios, a una solución azucarada altamente concentrada, típicamente al 32% (peso/volumen) y luego reciben una de menor concentración (solución azucarada al 4%). El efecto de contraste se expresa como una disminución abrupta del consumo de la solución del 4%, respecto de animales que siempre recibieron esa concentración (Flaherty, 1996). Esta respuesta es de carácter transitorio, por lo que después de algunos ensayos se observa una recuperación del efecto de contraste, ya que los animales adaptan su respuesta al nivel del grupo control. De este modo, en el CSNc se evalúa la frustración tanto a través de la intensidad de la supresión inicial del consumo, así como por la velocidad de recuperación del mismo en los ensayos subsiguientes. Tanto la teoría de Amsel (1992) como la de Gray y McNaughton (2000) coinciden en atribuir un componente primordialmente emocional al efecto de contraste negativo, proponiéndolo como un modelo de frustración análogo a un modelo de ansiedad aguda.

La frustración puede definirse como un estado emocional que se produce ante la disminución u omisión de la cantidad o calidad de un reforzador apetitivo en presencia de una expectativa de recompensa de mayor magnitud (Amsel, 1992). La misma produce efectos emocionales, conductuales y fisiológicos similares a una reacción de estrés y a los efectos provocados por la presentación o anticipación de estímulos aversivos (Gray & McNaughton, 2000; Konorsky, 1964).

Si bien un cuerpo considerable de datos farmacológicos, anatómicos y hormonales apoyan la teoría emocional de la frustración (e.g., Mustaca, Bentosela & Papini, 2000; Pecoraro, De Jong & Dallman, 2009), otras teorías plantearon que el efecto de contraste podría explicarse por procesos cognitivos (e.g., Capaldi, 1971), aunque fueron refutadas por varias evidencias empíricas (véase Flaherty, 1990). Finalmente, el modelo multietapas del CSNc de Flaherty (1996) propuso un punto de vista mixto (emocional y cognitivo) del CSNc. Esta perspectiva propone la existencia de diferentes procesos psicológicos y neuroquímicos que ocurren en el contraste (Ensayo 1 de postcambio) y su posterior recuperación (Ensayo 2 en adelante; Flaherty, 1996). En la primera etapa, la respuesta inicial del animal a la disminución del refuerzo involucraría procesos de detección del cambio, rechazo a consumir la solución devaluada y búsqueda de la solución de precambio. Esta respuesta inicial sería de naturaleza predominantemente cognitiva, proponiendo un proceso de comparación de la memoria del reforzador anterior con el presente y búsqueda de la sustancia perdida. En la segunda etapa, la

recuperación implicaría un mecanismo de conflicto o ansiedad, acompañándose de una elevación de la corticosterona y siendo sensible a la acción de sustancias ansiolíticas (Flaherty, Becker & Pohorecky, 1985; Mitchell & Flaherty, 1998).

Sobre este tipo de controversias teóricas las comparaciones de líneas endocriadas por selección psicogenética aportan datos relevantes al fin de distinguir entre los posibles componentes emocionales y cognitivos del contraste.

Un ejemplo de ratas seleccionadas en función de su reactividad emocional lo constituyen las sublíneas suizas de *Ratas Romanas* de alta (RHA/Verh, *Roman High Avoidance*) y baja evitación (RLA/Verh, *Roman Low Avoidance*). Estas cepas fueron seleccionadas en 1972 por su excelente (RHA/Verh) o extremadamente pobre capacidad (RLA/Verh) para adquirir la tarea de evitación en dos sentidos (Steimer & Driscoll, 2005). La cepa de ratas RLA se caracterizan por mostrar más reacciones de ansiedad que la cepa de RHA cuando son expuestas a situaciones de conflicto, novedad o estímulos condicionados e incondicionados que provocan miedo (Aguilar et al., 2002; Escorihuela et al., 1999), así como también una mayor activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Carrasco et al., 2008).

Si el CSNc presenta un componente primordialmente emocional como plantean Amsel (1992), Gray y McNaughton (2000), se esperaría que una cepa emocionalmente más reactiva, como las ratas RLA, presente un mayor efecto de contraste en comparación con las RHA.

Gómez et al. (2009) evaluaron ratas RHA-I y RLA-I hembras en el CSNc. No hallaron diferencias entre cepas cuando la solución azucarada se devaluó de 32% a 4%. Sin embargo, al variar la discrepancia de 22% a 4%, los animales de la cepa RHA-I tuvieron un efecto de contraste negativo en el primer ensayo de postcambio, mientras que los RLA-I lo expresaron durante cuatro ensayos. Estos resultados se pueden explicar en función de la reactividad emocional diferencial de las cepas RHA-I y RLA-I. Esta hipótesis se refuerza, al hallar que ambas cepas respondieron del mismo modo ante una prueba de contraste anticipatorio que no está relacionada con mecanismos emocionales (véase Gómez et al., 2009).

Estos resultados son consistentes con las predicciones de las teorías emocionales del CSNc, ya que la cepa con mayor reactividad emocional (RLA-I) expresa un entecimiento en su recuperación ante un evento frustrante. Como la respuesta inicial ante la devaluación del incentivo (primer ensayo de postcambio) fue igual en ambas cepas, no se puede descartar el modelo multiestado de Flaherty (1996).

Otros experimentos no replicaron las diferencias halladas por Gomez et al. (2009). Sabariego et al. (2010) realizaron el mismo experimento de CSNc (22%→4%) en ratas macho, incorporando un grupo de reforzamiento parcial en el que los animales reciben de modo impredecible durante la fase de precambio ensayos reforzados (solución azucarada al 22%) o no reforzados (agua destilada). En este caso, no se hallaron diferencias en la intensidad y velocidad de recuperación del contraste entre RHA-I y RLA-I, y ambas cepas presentaron el primer día de post-cambio efecto de reforzamiento parcial sobre el contraste (una menor supresión del consumo en el grupo con reforzamiento parcial, en comparación con el grupo de reforzamiento continuo).

Otros resultados contrarios a las teorías emocionales de la frustración sobre el CSNc se hallaron con las líneas de ratas *Maudsley Reactivas* (MR) y *Maudsley No Reactivas* (MNR). Estas líneas fueron seleccionadas por Broadhurst (1975) en función de su baja (MNR) o alta frecuencia (MR) de defecación en el campo abierto (Hall, 1934), una medida que ha sido validada como indicativa de la respuesta de ansiedad en ratas. Si bien las ratas MR y MNR son consideradas como cepas con expresiones extremas en los niveles de ansiedad, estas discrepancias se expresan solamente en algunas pruebas. Las MR presentan menor actividad locomotora en el campo abierto (Broadhurst, 1975), exploran menos los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado, y permanecen más tiempo inmóviles en la prueba de natación forzada, pero no se diferencian de las MNR en la prueba de evitación activa en dos sentidos (Overstreet, Rezvani & Janowsky, 1992). Algunos autores incluso han sugerido que las diferencias en el número de defecaciones en el campo abierto entre las líneas no se deberían a distintos niveles de emocionalidad o estrés, puesto que ambas tuvieron los mismos niveles de secreción de corticosteroides a nivel basal o en respuesta a pruebas de ansiedad (Abel, 1991). Rowan y Flaherty (1991) compararon ambas cepas en distintos procedimientos de contraste. En un CSNc (32→4) hallaron en las MR un contraste menos intenso que las MNR, y en el contraste simultáneo positivo y negativo un efecto más tenue en las MR. En el contraste anticipatorio ambas cepas respondieron del mismo modo. Estos datos no sólo no apoyan a las teorías emocionales del contraste, sino que muestran diferencias en la dirección opuesta a la esperada: un menor nivel de contraste en la cepa más ansiosa. Sin embargo, como las MR mostraron una atenuación de la respuesta en el contraste simultáneo, en el cual participan mecanismos de comparación sensorial, la disminución del efecto de CSNc pudo deberse a un déficit en los mecanismos de comparación entre las dos soluciones azucaradas. Por otra parte, como se detalló previamente, algunos componentes de la ansiedad son semejantes en ambas cepas, por lo cual, como modelo de ansiedad diferencial la validez de las *Maudsley* es parcial.

Otras comparaciones de cepas en la respuesta ante el CSNc fueron más exitosas. Por ejemplo, Bentosela y Mustaca (2005) compararon ratas espontáneamente hipertensas de la cepa *Okamoto* (SHR) contra sus controles genéticamente similares pero normotensas (*Wistar-Kyoto*, WKY) en un CSNc. Los trabajos previos mostraron que las SHR no sólo presentan un peor rendimiento en tareas de aprendizaje y memoria (Loupe, Schoreeder & Tessel, 1995), sino también una mayor actividad locomotora (Knardhal & Karlsen, 1984). Con respecto a los niveles de ansiedad característicos de estas cepas, parecen depender de los procedimientos y medidas utilizados. Algunos sugieren una mayor emocionalidad en las SHR (Armario, Gabaldá & Martá, 1995), mientras que en otros, las SHR muestran menores indicadores de miedo (Hard et al., 1984).

En el experimento de CSNc (32→4), Bentosela y Mustaca (2005) concluyen que las SHR no exhibieron déficit en el aprendizaje y en la memoria en el CSNc, ya que presentaron una adquisición similar a los WKY durante las sesiones de precambio. Sin embargo, las ratas SHR exhibieron un efecto de contraste negativo más intenso y duradero que las WKY. Estos resultados constituyen una evidencia en favor de las teorías emocionales del CSNc, puesto que las diferencias fueron encontradas tanto en las reacciones iniciales como en las tardías ante la devaluación del incentivo. De todos modos, existe la posibilidad que estas diferencias se deban a la mayor actividad locomotora característica de las SHR, que podría interferir con el consumo. Si bien las autoras consideran poco probable esta posibilidad, debido a que las líneas no muestran diferencias en sus niveles de consumo durante la fase de precambio, no se la puede descartar por completo, ya que las ratas SHR podrían presentar mayor nivel de locomoción específicamente ante situaciones de estrés o cambio, como es la devaluación del incentivo.

Los resultados hallados en ratas SHR y sus controles son similares a los obtenidos al comparar ratas *Syracusa* de Alta Evitación (*Syracuse High Avoidance*, SHA) con *Syracusa* de baja evitación (*Syracuse Low Avoidance*, SLA). Estas cepas fueron seleccionadas por su aprendizaje de evitación activa, y si bien no difieren en sus niveles de actividad locomotora, capacidad sensorial o habilidad de aprendizaje general, muestran diferencias en su reactividad emocional, mostrando mayores niveles de ansiedad las SLA (e.g., mayor defecación en el campo abierto y tigmotaxis) (Brush et al., 1985). Flaherty y Rowan (1989) hallaron que las SLA exhibieron un CSNc más intenso, y que la droga ansiolítica clordiazepóxido (CDP) atenuaba el CSNc, mientras que las SHA mostraron un contraste de menor intensidad y no eran sensibles al CDP.

Finalmente, un trabajo comparó las ratas *Lewis* con las *Fischer 344* en un CSNc. La línea *Lewis* ha sido caracterizada por su alta preferencia hacia los

refuerzos apetitivos en comparación con las *Fischer*, que presentan una insensibilidad relativa a los mismos (Martin et al., 2003). Freet, Tesche, Tompers, Riegel y Grigson (2006) hallaron que las ratas *Lewis* mostraban una preferencia por las soluciones azucaradas en la fase de precambio, en comparación con las *Fischer*. Por este motivo, compararon ambas cepas utilizando la tasa de cambio, medida que se obtiene a través de la razón entre el consumo del primer ensayo del postcambio y el último del precambio (Ensayo 11/Ensayo 10), con el fin de comparar la magnitud de la supresión del consumo con independencia del nivel de respuesta basal. Hallaron que las ratas *Lewis* mostraban una supresión del consumo significativamente mayor a las *Fischer*, y que estas últimas eran sensibles al efecto del CDP, mientras que las *Lewis* no.

En conjunto, todos estos datos permiten realizar ciertas conclusiones preliminares. Por un lado, el efecto del CSNc se manifestó en todas las líneas estudiadas, lo cual muestra que, si bien puede estar influenciado por factores genéticos y aprendidos, es un fenómeno robusto que se relaciona con la experiencia. Por otro lado, las predicciones que surgen de la teoría emocional de la frustración (que las cepas más emocionales o menos sensibles al valor del refuerzo presentarían un menor CSNc) se cumplen en las cepas que no difieren en sus niveles de locomoción, pero sí en su reactividad emocional (SHA vs. SLA) o en su nivel de sensibilidad a los incentivos (Lewis vs. Fischer). En el caso de la comparación SHR vs. WK también se encontraron datos consistentes con las predicciones de la teoría de la frustración, ya que las SHR presentaron una mayor intensidad de contraste y un efecto más duradero. En este caso particular, las características de la línea SHR probablemente facilitaron la expresión de diferencias en la dirección predicha por las teorías emocionales de la frustración, ya que las SHR no sólo presentan un nivel de reactividad más elevado, sino que también son más activas.

Estos resultados apoyarían las teorías emocionales del CSNc, las cuales interpretan dicho fenómeno como la expresión de un estado emocional aversivo: la frustración. Vale destacar que en estas comparaciones no sólo se encontraron diferencias en la velocidad de recuperación de la respuesta consumatoria, sino también en la intensidad del contraste en el primer día de postcambio. De esta manera, estos datos no apoyarían la teoría multiestado de Flaherty (1996), puesto que de la misma se hubiese esperado ausencia de diferencias en las etapas iniciales del CSNc.

Por otra parte, los resultados provenientes de las comparaciones entre RHA-I vs. RLA-I y MR vs. MNR resultan contrarios a las predicciones de las teorías emocionales del contraste. En relación con las *Ratas Romanas*, no se encuentran diferencias consistentes entre las cepas, mientras que en las

Maudsley las diferencias halladas van en la dirección opuesta a la esperada, ya que las MR (más emocionales) presentaron menor contraste. En ambos casos, el proceso de selección psicogenética co-seleccionó divergencias no sólo en los niveles de estrés y ansiedad, sino también en la actividad locomotora. Es posible que ante una situación de cambio y estrés, como el CSNc, las ratas menos emocionales y más activas (RHA y MNR) respondan a la situación con un estilo de afrontamiento activo y una mayor locomoción, respuesta que compite e interfiere con la conducta de consumo, lo que podría explicar, al menos parcialmente, los resultados contradictorios con las teorías emocionales de la frustración en estas cepas.

PROCEDIMIENTOS INSTRUMENTALES APETITIVOS

En la mayoría de los experimentos del *Contraste Sucesivo Negativo instrumental* (CSNi) se devalúa la cantidad del refuerzo obtenido, y se mide la conducta anticipatoria o instrumental que el animal debe realizar para obtener el refuerzo, por ejemplo, la velocidad de recorrido de un laberinto recto (Leszczuk & Flaherty, 2000).

En la fase de precambio del CSNi un grupo experimental debe adquirir la respuesta de recorrido de un laberinto lineal para recibir una recompensa de alta magnitud (e.g. 10 *pellets*), mientras que un grupo control recibe una recompensa menor (e.g. 1 *pellet*). En la fase de postcambio ambos grupos reciben la cantidad menor de refuerzo. El efecto de CSNi se evidencia en un aumento significativo y transitorio del tiempo de recorrido del grupo experimental comparado con el grupo control. Cuando en la fase de postcambio el animal se encuentra ante la ausencia del reforzador esperado, el procedimiento se denomina *extinción instrumental* (Amsel, 1992).

Rosas et al. (2007) compararon a ratas RHA-I y RLA-I hembras en un CSNi. En un primer experimento, el grupo experimental pasaba de una fase de precambio de 12 *pellets* a una fase de postcambio de 1 *pellet*. Hallaron efecto de contraste tanto en las RHA-I como en las RLA-I. Sin embargo, cuando en un siguiente experimento disminuyeron la discrepancia entre los reforzadores (12 *pellets* → 2 *pellets*) encontraron que solamente las ratas RLA-I presentaron el efecto de CSNi. Estos hallazgos fueron replicados en ratas macho por Sabariego et al. (2010). Además se halló que las ratas RLA-I, cuando eran entrenadas en la fase de precambio en un programa de reforzamiento parcial, mostraban *Efecto de Reforzamiento Parcial sobre el Contraste instrumental* (ERP-Ci), emparejando sus respuestas a las RHA-I y beneficiándose del aprendizaje previo al generar una mayor persistencia en la respuesta. Las diferencias encontradas en CSNi entre la cepa RHA-I, menos reactiva emocionalmente, y la cepa RLA-I, más reactiva emocionalmente, podrían

considerarse un apoyo adicional para aquellas teorías que se basan en mecanismos emocionales para explicar este fenómeno.

Estos datos obtenidos en las ratas *Romanas* son consistentes con los hallados por Eysenck y Broadhurst (1964) en las ratas MR (mayor reactividad emocional) y las MNR (menor reactividad emocional). En un experimento para el estudio de las bases genéticas de la motivación, los autores compararon ambas cepas en un CSNi con un corredor recto, y hallaron que tanto las MR como las MNE mostraban efecto de contraste, pero que en las MR el efecto era de una mayor intensidad.

En conjunto, estos estudios muestran que en los procedimientos instrumentales apetitivos se verifican las hipótesis derivadas de las teorías emocionales del contraste, puesto que el fenómeno se expresó con mayor claridad e intensidad en las cepas con niveles altos de ansiedad (RLA-I y MR) en comparación con las cepas menos ansiosas (RHA-I y MNR). Es importante destacar que, mientras las comparaciones en cepas de ratas *Romanas* y *Maudsley* arrojaron datos contrarios a las teorías emocionales del contraste en procedimientos consumatorios, en el caso de los paradigmas instrumentales las mismas comparaciones las apoyaron. Las diferencias tal vez radican en que en el CSNi los animales deben afrontar de modo activo el evento estresante de devaluación del incentivo, puesto que la respuesta registrada (velocidad de recorrido) depende de la locomoción. Debido a que las ratas RHA-I y MNR, además de su menor reactividad emocional muestran un nivel de locomoción superior, este rasgo favorecería la expresión de sus diferencias en los procedimientos de contraste que adopten como medida dependiente conductas de actividad, mientras que en el CSNc la locomoción interfiere con la respuesta de consumo.

Los datos comparativos con ratas RHA-I y RLA-I en la *extinción instrumental* (Ei) también arrojaron resultados consistentes con las teorías emocionales de la frustración. Gómez et al. (2009) compararon tres grupos de ratas hembras (RHA-I, RLA-I y Wistar) que fueron expuestas a una Ei en un laberinto recto (12 *pellets*→0). En la adquisición no hubo diferencias entre cepas. En cambio, en la fase de extinción, las ratas RHA-I mostraron una menor latencia de respuesta en las dos primeras sesiones frente a las cepas RLA-I y Wistar, expresando así una mayor resistencia a la extinción.

Estos resultados se pueden explicar atendiendo a mecanismos emocionales vinculados con la omisión inesperada del refuerzo. Así, dicha omisión pudo haber generado una reacción de frustración y *freezing* más intensa en la cepa RLA-I, que podría haber impedido la ejecución de la respuesta instrumental requerida, facilitando de este modo su extinción. Esta reacción emocional probablemente fue menor en la cepa RHA-I, y en conjunto con su

tendencia a responder de modo activo las situaciones de estrés, le permitió mostrar una mayor persistencia comportamental y resistencia a la extinción.

En otro experimento de Gómez et al. (2008), se estudió el comportamiento de las ratas RHA-I y RLA-I hembras durante la extinción de una respuesta instrumental, tras haber sido entrenadas en la fase de adquisición a un programa de reforzamiento continuo o parcial. Las ratas RLA-I expuestas al programa de reforzamiento continuo mostraron una mayor latencia de respuesta que las expuestas a reforzamiento parcial durante las tres primeras sesiones (ERPE), no observándose este efecto en la cepa RHA-I. Además, la cepa RLA-I entrenada con reforzamiento continuo mostró una mayor latencia de respuesta (menor persistencia) frente a la cepa RHA-I que recibió el mismo programa de reforzamiento.

En conjunto, estos resultados sobre Ei mostraron que las diferencias RHA-I/RLA-I que se observan durante la extinción de una respuesta instrumental dependen de la experiencia previa con el reforzador, apareciendo dichas diferencias bajo un programa de reforzamiento continuo y no bajo reforzamiento parcial.

PROCEDIMIENTOS INSTRUMENTALES AVERSIVOS

En el CSN de la prueba de evitación en un sentido el animal es colocado en el compartimento en el que tras la presentación de una señal (tono/luz), el animal recibe una descarga eléctrica. Con el entrenamiento los animales aprenden a evitar la descarga en cuanto aparece la señal, corriendo a otro compartimento de seguridad, en el cual nunca reciben ni la señal ni la descarga (Mackintosh, 1983). En el contexto de esta prueba, el CSN se obtiene reduciendo el tiempo que el animal permanece en el compartimento seguro, partiendo de la hipótesis de que los estímulos asociados con ausencia de descarga se convierten en estímulos condicionados inhibitorios de miedo capaces de adquirir propiedades reforzantes comparables a reforzadores, como el agua o la comida (Cándido, Maldonado, Megías & Catena, 1992; Morales et al., 1992). Una vez que el sujeto adquiere la respuesta de evitación con un tiempo de permanencia en el lugar seguro de 30 s (fase de pre-cambio), este tiempo es reducido a 1 s (fase de postcambio). El rendimiento de este grupo es comparado con el de un grupo control que durante la adquisición de la respuesta de evitación permanece 1 s en el compartimento de seguridad. Los trabajos previos evidencian que la ejecución del grupo experimental muestra un deterioro de la respuesta de evitación (Cándido et al., 1992) con respecto al grupo control, y que este deterioro implicaría una reacción emocional aversiva provocada por la reducción en la magnitud de un reforzador esperado (el tiempo en el compartimento seguro), ya que este

efecto de CSN puede ser atenuado o eliminado por la administración de agentes ansiolíticos gabaérgicos como el diazepam (Morales, Torres, Megías, Cándido & Maldonado, 1992) o el tiopental sódico (Torres, Morales, Cándido & Maldonado, 1996).

Los estudios comparativos de ratas RLA-I y RHA-I hallaron la presencia de CSN más intenso (un mayor deterioro de la respuesta de evitación del grupo experimental en comparación con el grupo control) en las RLA-I y en la cepa neutra Wistar, en comparación con las RHA-I (Torres et al., 2005).

Las cepas RLA-I y RHA-I también se compararon en el efecto de *contraste sucesivo positivo* (CSP) con este mismo paradigma. En este caso los sujetos de un grupo experimental son entrenados para adquirir la respuesta de evitación en la fase de precambio permaneciendo 1 s en el compartimento de seguridad, mientras que en la fase de postcambio se incrementa a 30 s. Se halló que solamente las RLA-I mostraron efecto de CSP, puesto que mejoraron su rendimiento en la prueba de evitación en comparación con sus controles, que siempre fueron entrenados con el reforzador de alta magnitud (30 s) (Maldonado et al., 2007). Los autores interpretan estos resultados como una expresión de la baja emocionalidad de las RHA-I en comparación con las RLA-I, puesto que el patrón de comportamiento exhibido por las RHA-I sería similar al que muestran ratas *Wistar* luego de la administración de la droga ansiolítica diazepam (Maldonado, Cándido, Morales & Torres, 2006). No obstante, otra posibilidad es que las RHA-I no expresen CSP porque antes del cambio hayan alcanzado su máximo nivel de respuesta y un efecto de techo impida la expresión del fenómeno.

Cabe destacar que, al igual que en los procedimientos instrumentales apetitivos, los datos hallados en este paradigma por las comparaciones con ratas *Romanas* también apoyan las teorías emocionales de los efectos de contraste. Las cepas de ratas RHA-I y RLA-I expresarían más claramente sus diferencias emocionales en aquellos procedimientos de contraste sucesivo (negativo o positivo) que requieren una respuesta locomotora (procedimientos instrumentales apetitivos y aversivos), mientras que los procedimientos consumatorios serían menos sensibles a las diferencias de estas líneas, debido a que sus diferencias en el nivel de activación general alteraría indirectamente la respuesta dependiente: el consumo.

SELECCIÓN PSICOGENÉTICA EN FUNCIÓN DE LAS RESPUESTAS EN EL CSNC

Flaherty et al. (1994) fueron los únicos que reportaron investigaciones con ratas *Sprague-Dawley* seleccionadas en función de su baja o alta reactivi-

dad ante situaciones de devaluación del incentivo. De este modo, diferenciaron dos líneas de ratas basándose en su comportamiento ante la devaluación del incentivo. Realizaron un proceso de selección a través de siete generaciones en que eran sometidas a una tarea de CSNc (32→4%). El criterio utilizado para la elección de los padres de la siguiente generación fue el grado de reducción de la frecuencia de lameteo (tasa de cambio: Ensayo 11/Ensayo 10). Este procedimiento se llevó a cabo siete veces hasta que se obtuvieron dos cepas con marcadas diferencias en CSNc: ratas con Contraste Alto (CA) y las de Contraste Bajo (CB), las cuales no diferían en sus respuestas ante el valor absoluto del refuerzo, pero sí ante la devaluación inesperada del mismo.

Con el objetivo de discernir si las diferencias en contraste están relacionadas con la actividad locomotora general que muestran los animales, Flaherty y su grupo decidieron someter a estas cepas a la tarea de campo abierto, ya que numerosos estudios previos manifiestan que ante la reducción de la recompensa, la actividad de los sujetos aumenta (Flaherty, Blitzer & Collier, 1978; Pellegrini & Mustaca, 2000; Wookey & Strongman, 1974).

Este experimento se realizó desde la cuarta hasta la séptima generación filial, y tenía lugar antes de ser sometidos a la prueba de CSNc. Un subconjunto de la F₇ realizó la prueba de campo abierto bajo la administración de la benzodiazepina midazolam y tras la realización de la tarea de CSNc. Se incluyeron, asimismo, animales sin experiencia y no seleccionados (no pertenecientes a ninguna de las cepas). Las ratas del grupo CA registraron más cruces que las CB (en la F₆ y F₇), mientras que las diferencias en el resto de generaciones analizadas no fueron estadísticamente significativas.

Vale mencionar que en este estudio los autores concluyen que el efecto de selección fue más efectivo en la dirección del comportamiento de alto contraste, y que en la dirección de bajo contraste el procedimiento habría sido aparentemente inefectivo. Esto se debe a que los animales CB, aún en la generación F₇, presentaron tasas de cambio menores que los de su generación parental. A su vez, las tasas de cambio de los animales CB oscilaron a lo largo de las siete generaciones en el rango de 0.4 y 0.6, valores intermedios en ratas *Sprague Dawley* sin selección.

Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la tendencia a mostrar altos niveles de contraste puede seleccionarse junto con una tendencia al incremento de la actividad. A pesar de esto, los análisis correlacionales realizados no indicaron asociación alguna entre la actividad en el campo abierto y la tasa de cambio, y cuando los animales fueron probados en otra prueba para la evaluación de la actividad, el laberinto radial, no se hallaron diferencias significativas entre las líneas CA y CB.

En un cuarto experimento, Flaherty et al. (1994) evaluaron a estas cepas de ratas en un contraste anticipatorio usando las mismas soluciones (32% y 4%). Hallaron que ambas líneas endocriadas obtuvieron un efecto de contraste anticipatorio equivalente, lo cual es una prueba de que los mecanismos subyacentes a estos dos tipos de contraste son distintos y que la selección de estas cepas fue específica para el CSNc.

En definitiva, este trabajo sugiere que el CSNc podría implicar, principalmente en sujetos que muestran altos niveles de contraste, una serie de factores independientes de la reactividad emocional general y de las respuestas a valores absolutos de recompensa (Flaherty et al., 1994), como es la actividad locomotora. *

CONCLUSIONES

El estudio de las diferencias comportamentales que muestran cepas de animales genéticamente seleccionados en situaciones de pérdida de recompensa pone en evidencia que el rasgo temperamental de reactividad emocional constituye un perfil conductual que integra a las respuestas inducidas por frustración, además de aquellas activadas por novedad y castigo. Estas evidencias apoyan las teorías defensoras de las similitudes existentes entre estos estados emocionales (Gray & McNaughton, 2000).

Los estudios revisados muestran que las comparaciones entre ratas *Romanas* y *Maudsley* en procedimientos instrumentales apoyan las teorías emocionales del fenómeno de contraste, evidenciando una respuesta de frustración incrementada ante la devaluación u omisión inesperada del incentivo en las líneas más emocionales (RLA y MR). También las comparaciones de las líneas *Syracusa*, *Lewis*, *Fischer* e *hipertensas* arrojaron datos consistentes con dichas teorías en los procedimientos consumatorios, aunque en estos paradigmas las comparaciones en *Romanas* y *Maudsley* hayan arrojados datos contradictorios y opuestos a las hipótesis de la teoría de la frustración. Estas discrepancias podrían explicarse por la cosegregación de otros rasgos comportamentales, como la actividad locomotora.

El estudio de Flaherty et al. (1994) sugiere que la intensidad del CSNc podría estar influida por componentes genéticos vinculados con un mayor o menor grado de actividad locomotora, sugiriendo que en el CSNc se encuentran mecanismos no emocionales implicados en la respuesta, y que estos componentes posiblemente expliquen las dificultades para hallar diferencias entre cepas en el CSNc cuando los animales menos reactivos emocionalmente son a su vez más activos y buscadores de novedad, como es el caso de las ratas RHA y MNR.

La aproximación psicogenética al estudio de la frustración es una valiosa herramienta para el abordaje de las bases genéticas de estas conductas y puede arrojar luz sobre la comprensión de los factores que determinan la vulnerabilidad individual a desarrollar trastornos psicopatológicos vinculados con estas experiencias, un acercamiento que puede tener una extraordinaria relevancia en la prevención y el tratamiento de estos trastornos.

No obstante, esta aproximación científica tiene limitaciones que no deben olvidarse: a) con frecuencia las cepas utilizadas difieren en más de un rasgo temperamental, lo que complica la elección de las pruebas conductuales, de las variables dependientes a medir, y la interpretación de los resultados; b) si bien son numerosos los estudios con cepas endocriadas en las respuestas de frustración, se ha avanzado muy poco hasta el momento en la identificación de los genes específicos que podrían ser los responsables de las divergencias comportamentales observadas. Experimentos actuales (Sabariego et al., en prensa) intentan aportar en un futuro cercano datos sobre la expresión diferencial de genes en ratas *Romanas*.

En definitiva, los estudios revisados en estas páginas ponen de manifiesto la robustez de los fenómenos comportamentales inducidos por experiencias de pérdida, la naturaleza emocional de estos fenómenos, la interacción en su determinación genética y aprendida, y las disociaciones entre procedimientos instrumentales y consumatorios.

REFERENCIAS

- Abel, E. L. (1991). Behavior and corticosteroid response of maudley reactive and nonreactive rats in the open field and forced swimming test. *Physiology & Behavior*, 50(1), 151-153.
- Aguilar, R., Gil, L., Flint, J., Gray, J., Dawson, G. R., Driscoll, P., Giménez-Llort, L., Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A. & Tobeña, A. (2002). Learned fear, emotional reactivity and fear of heights: A factor analytic map from a large F₂ intercross of Roman rat strains. *Brain Research Bulletin*, 57(1), 17-26.
- Amsel, A. (1992). *Frustration theory: An analysis of dispositional learning and memory*. New York: Cambridge University Press.
- Armario, A., Gavaldá, A. & Martá, J. (1995). Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. *Psychoneuroendocrinology*, 20(8), 879-890.
- Bentosela, M. & Mustaca, A. E. (2005). Efectos del contraste sucesivo negativo consumatorio en ratas hipertensas: ¿una cuestión de memoria o de emoción? *Suma Psicológica*, 12(1), 87-100.

- Broadhurst, P. L. (1969). Psychogenetics of Emotionality in the Rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 159, 806-824.
- Broadhurst, P. L. (1975). The Maudsley reactive and nonreactive strains of rats: A survey. *Behavior Genetics*, 5(4), 299-319.
- Brush, F. R., Baron, S., Froehlich, J. C., Ison, J. R., Pellegrino, L. J., Phillips, D. S., Sakellaris, P. C. & Williams, V. N. (1985). Genetic differences in avoidance learning by *Rattus norvegicus*: Escape/avoidance responding, sensitivity to electric shock, discrimination learning and open field behavior. *Journal of Comparative Psychology*, 99(1), 60-73.
- Cándido, A., Maldonado, A., Megías, J. L. & Catena, A. (1992). Negative successive contrast* in one-way avoidance learning in rats. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 45(B), 15-32.
- Capaldi, E. D. (1971). Simultaneous shifts in reward magnitude and level of food deprivation. *Psychonomic Science*, 23, 357-359.
- Carrasco, J., Márquez, C., Nadal, R., Tobeña, A., Fernández-Teruel, A. & Armario, A. (2008). Characterization of central and peripheral components of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in the inbred Roman rat strains. *Psychoneuroendocrinology*, 33(4), 437-445.
- Cuenya, L., Kamenetzky, G. V. & Mustaca, A. E. (2008). Dimensiones temperamentales en roedores: aspectos metodológicos y conceptuales. En M. C. Richaud & J. E. Moreno (Ed.). *Investigación en Ciencias del Comportamiento. Avances Iberoamericanos* (pp. 849-873). Buenos Aires: CIIPME - CONICET.
- Escorihuela, A., Fernández-Teruel, A., Gil, L., Aguilar, R., Tobeña, A. & Driscoll, P. (1999). Inbred Roman High- and Low-Avoidance Rats: Differences in Anxiety, Novelty-Seeking, and Shuttlebox Behaviors. *Physiology & Behavior*, 67(1), 19-26.
- Eysenck, H. J. & Broadhurst, P. L. (1964). Experiments with animals: Introduction. En H. Eysenck (Ed.). *Experiments in motivation* (pp. 285-291). Elmsford, NY: Pergamon Press.
- Flaherty, C. F. (1990). Effect of anxiolytics and antidepressant on extinction and negative contrast. *Pharmacology Therapy*, 46(2), 309-320.
- Flaherty, C. F. (1996). *Incentive relativity*. New-York: 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 and Behavior*, 11(4), 407-414.

- Flaherty, C. F., Becker, H. C. & Pohorecky, L. (1985). Correlation of corticosterone elevation and negative contrast varies as a function of post-shift day. *Animal Learning & Behavior*, 13(3), 309-314.
- Flaherty, F. C., Blitzer, R. & Collier, G. H. (1978). Open-field behaviors elicited by reward reduction. *American Journal of Psychology*, 91(3), 429-443.
- Flaherty, F. C., Krauss, K. L., Rowan, G. A. & Grigson, P. S. (1994). Selective breeding for negative contrast in consummatory behavior. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 20(1), 3-19.
- Flaherty, C. F. & Mitchell, C. (1999). Absolute and Relative Rewarding Properties of Fructose, Glucose, and Saccharin Mixtures as Reflected in Anticipatory Contrast. *Physiology & Behavior*, 66(5), 841-853.
- Flaherty, C. F. & Rowan, G. A. (1989). Rats (*Rattus norvegicus*) Selectively Bred to Differ in Avoidance Behavior Also Differ in Response to Novelty Stress, in Glycemic Conditioning, and in Reward Contrast. *Behavioral and Neural Biology*, 51(2), 145-164.
- Freet, C. S., Tesche, J. D., Tompers, D. M., Riegel, K. E. & Grigson, P. S. (2006). Lewis rats are more sensitive than Fischer rats to successive negative contrast, but less sensitive to the anxiolytic and appetite-stimulating effects of chlordiazepoxide. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 85 (2), 378-384.
- Gómez, M. J., De la Torre, L., Callejas-Aguilera, J. E., Lerma-Cabrera, J. M., Rosas, J. M., Escarabajal, M. D., et al. (2008). The partial reinforcement extinction effect (PREE) in female Roman high- (RHA-I) and low-avoidance (RLA-I) rats. *Behavioral Brain Research*, 194(2), 187-192.
- Gómez, M. J., De la Torre, L., Callejas-Aguilera, J. E., Rosas, J. M., Escarabajal, M. D., Agüero, A., Tobeña, A., Fernández-Teruel, A. & Torres, C. (2009). Differences in Extinction of an Appetitive Instrumental Response in Female Inbred Roman High- (RHA-I) and Low- (RLA-I) Avoidance Rats. *Psicológica*, 30(2), 181-188.
- Gray, J. A. & McNaughton, N. (2000). *The Neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hipocampal system* (2ª Ed.). Oxford: Oxford University Press.
- Hall, C. S. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18(3), 385-403.
- Hard, E., Carlsson, S. G., Jern, S., Larsson, K., Lindh, A. S. & Svensson, L. (1984). Behavioral Reactivity in Spontaneously Hypertensive Rats. *Physiology & Behavior*, 35(4), 487-492.

- Hull, C. L. (1943). The problem of intervening variables in molar behavior theory. *Psychological Review*, 50(3), 273-291.
- Kamenetzky, G. V., Cuenya, L., Elgier, A. M., López Seal, F., Fosachea, S., Martin, L. & Mustaca, A. E. (2009). Respuestas de Frustración en Humanos. *Terapia Psicológica*, 27(2), 191-201.
- Knardhal, S. & Karlsen, K. (1984). Passive avoidance behavior of spontaneously hypertensive rats. *Behavioral and Neural Biology*, 42(1), 9-22.
- Konorsky, J. (1964). *Integrative activity of the brain*. Chicago: University of Chicago Press.
- Leszczuk, M. & Flaherty, C. F. (2000). Lesions of nucleus accumbens reduce instrumental but not consummatory negative contrast in rats. *Behavioral Brain Research*, 116(1), 61-79.
- Loupe, P. S., Schroeder, S. R. & Tessel, R. (1955). FR discrimination training effects in SHR and microencephalic rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 51(4), 869-876.
- Mackintosh, N. J. (1983). *Conditioning and associative learning*. Oxford: Oxford University Press.
- Maldonado, A., Cándido, A., Morales, A. & Torres, C. (2006). The effect of diazepam on successive positive contrast in one-way avoidance learning. *International Journal of Psychology and Psychological Therapy*, 6(2), 249-260.
- 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(5), 803-808.
- Martin, S., Lyupina, Y., Crespo, J. A., Gonzalez, B., Garcia-Lecumberri, C. & Ambrosio, E. (2003). Genetic differences in NMDA and D1 receptor levels, and operant responding for food and morphine in Lewis and Fischer 344 rats. *Brain Research*, 973(2), 205-213.
- Mitchell, C. & Flaherty, C. (1998). Temporal dynamics of corticosterone elevation in successive negative contrast. *Physiology & Behavior*, 64(3), 287-292.
- Morales, A., Torres, M. C., Megías, J. L., Cándido, A. & Maldonado, A. (1992). Effect of diazepam on successive negative contrast in one-way avoidance learning. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, 43(1), 153-157.
- Mustaca, A. E., Bentosela, M. & Papini, M. R. (2000). Consummatory successive negative contrast in mice. *Learning and Motivation*, 31(3), 272-282.
- Mustaca, A. E. & Kamentzky, G. V. (2006). Alcoholismo y Ansiedad: Modelos Animales. *International Journal of Psychology and Psychological Therapy*, 6(3), 343-364.
- Ortega, L. A. & Papini, M. R. (2007). Estudio del Contraste entre Incentivos: La Contribución de Abram Amsel. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 39(3), 609-621.
- Overstreet, D. H., Rezvani, A. H. & Janowsky, D. S. (1992). Maudsley reactive and nonreactive rats differ only in some tasks reflecting emotionality. *Physiology & Behavior*, 52(1), 149-152.
- Papini, M. R. (2003). Comparative Psychology of Surprising Nonreward. *Brain, Behavior and Evolution*, 62(2), 83-95.
- Papini, M. R. (2009). *Psicología Comparada. Evolución y desarrollo del comportamiento*. México, DF: Manual Moderno.
- Papini, M. R., Wood, M., Daniel, A. M. & Norris, J. N. (2006). Reward loss as psychological pain. *International Journal of Psychology and Psychological Therapy*, 6(2), 189-213.
- Pecoraro, N., De Jong, H. & Dallman, M. F. (2009). An unexpected reduction in sucrose concentration activates the HPA axis on successive post shift days without attenuation by discriminative contextual stimuli. *Physiology and Behavior*, 96(4-5), 651-661.
- Pellegrini, S. & Mustaca, A. E. (2000). Consummatory Successive Negative Contrast with Solid Food. *Learning and Motivation*, 31(2), 200-209.
- Pellegrini, S., Muzio, R., Mustaca, A. E. & Papini, M. R. (2004). Successive negative contrast after partial reinforcement in the consummatory behavior. *Learning and Motivation*, 35(4), 303-321.
- Reilly, S. & Pritchard, T. C. (1997). Gustatory Thalamus Lesions in the Rat: III. Simultaneous Contrast and Autosshaping. *Physiology & Behavior*, 62(6), 1355-1363.
- Rosas, J. M., Callejas-Aguilera, J. E., Escarabajal, M. D., Gómez, M. J., De la Torre, L., Agüero, A., Tobeña, A., Fernández-Teruel, A. & Torres, C. (2007). Successive negative contrast effect in instrumental runway behaviour: A study with Roman high- (RHA) and Roman low- (RLA) avoidance rats. *Behavioural Brain Research*, 185(1), 1-8.
- Rowan, G. A. & Flaherty, C. F. (1991). Behavior of Maudsley reactive and nonreactive rats (*Rattus norvegicus*) in three consummatory contrast paradigms. *Journal of Comparative Psychology*, 105(2), 115-124.
- Sabariago, M., Cuenya, L., Donaire, R., Rodríguez, P., Fernández-Teruel, Mustaca, A. & Torres, C. (2010). Efecto de Refuerzo Parcial en el Contraste Sucesivo Negativo Instrumental y Consumatorio en Ratas Romanas Macho de Alta y Baja Evitación. En *Libro de Resúmenes del XXII Congreso de la Sociedad Española de Psicología Comparada* (p. 5).

- Sabariego, M., Gómez, M. J., Morón, I., Fernández-Teruel, A., Tobeña, A., Cañete, A., et al. (en prensa). *Gene expression analysis in inbred Roman High-(RHA-I) and Low-(RLA-I) Avoidance rats.*
- Scully, J. A., Tosi, H. & Banning, K. (2000). Life event checklists: Revisiting the Social Readjustment Rating Scale after 30 years. *Educational and Psychological Measurement*, 60(6), 864-876.
- Steimer, T. & Driscoll, P. (2005). Inter-individual vs line/strain differences in psychogenetically selected Roman High-(RHA) and Low-(RLA) Avoidance rats: neuroendocrine and behavioural aspects. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22(1), 99-112.
- Torres, C., Cándido, A., Escarabajal, M. D., De la Torre, L., Maldonado, A., Tobeña, A. & Fernández-Teruel, A. (2005). Successive negative contrast in one-way avoidance learning in female roman rats. *Physiology & Behavior*, 85(5), 377-382.
- Torres, M. C., Morales, A., Cándido, A. & Maldonado, A. (1996). Successive negative contrast in one-way avoidance: effect of thiopental sodium and chlorpromazine. *European Journal of Pharmacology*, 314(3), 269-275.
- Wookey, P. E. & Strongman, K. T. (1974). Reward shift and general activity in the rat. *British Journal of psychology*, 65(1), 103-110.

ANEXO II

Cuenya, L., Sabariego, M., Donaire, R., Fernández-Teruel, A., Tobeña, A., Gómez, M.J., Mustaca, A., Torres, C. (2012). The effect of Partial Reinforcement on Instrumental Successive Negative Contrast in inbred Roman High- (RHA-I) and Low-(RLA-I) Avoidance Rats. *Physiology & Behavior*, 105, 1112-1116.



The effect of partial reinforcement on instrumental successive negative contrast in inbred Roman High- (RHA-I) and Low- (RLA-I) Avoidance rats

L. Cuenya ^{a,*}, M. Sabariego ^{b,1}, R. Donaire ^b, A. Fernández-Teruel ^c, A. Tobeña ^c, M.J. Gómez ^b, A. Mustaca ^a, C. Torres ^b

^a Laboratory of Experimental and Applied Psychology (PSEA), Lanari Institute of Medical Research (IDIM), University of Buenos Aires, CONICET, Buenos Aires, Argentina

^b Department of Psychology, University of Jaén, Campus Las Lagunillas s/n Edif. C-5, 23071 Jaén, Spain

^c Medical Psychology Unit, Department of Psychiatry and Forensic Medicine, Institut de Neurociències, School of Medicine, Autonomous University of Barcelona, Campus Bellaterra, 08193, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2011

Received in revised form 10 December 2011

Accepted 12 December 2011

Available online 21 December 2011

Keywords:

Anxiety

Partial reinforcement

Roman rat

Successive negative contrast

ABSTRACT

Frustration is an emotional response that can be induced by the sudden devaluation of a reinforcer in the presence of greater reinforcement expectancies (e.g. instrumental successive negative contrast, iSNC). This emotional response seems to be similar to anxiety and can be attenuated by previous experiences of reward loss (e.g. partial reinforcement, PR, as opposed to continuous reinforcement, CR). In this study we used iSNC and PR procedures in order to compare the performance of two strains of rats psychogenetically selected on the basis of their emotional reactivity: the inbred Roman High- (RHA-I, low anxiety) and Low- (RLA-I, high anxiety) Avoidance rats. Animals were exposed to a straight alley, where they were changed from 12 pellets in the preshift phase (presented in 100% of trials—CR vs. 50% of trials—PR) to 2 pellets in the postshift phase, or exposed to 2 pellets throughout the training. The results indicated that the iSNC only appeared in RLA-I rats exposed to CR, as opposed to RLA-I animals exposed to PR and to RHA-I rats exposed to PR or CR. These data seem to support the implication of emotional responses in both iSNC and PR situations, and indicate that the behavioral reactivity to reward loss experiences is modulated by genetic variables.

Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

The Roman High- (RHA/Verh) and Low- (RLA/Verh) Avoidance rats, derived from Wistar rats, were initially selected and bred on the basis of their good (RHA/Verh) vs. poor (RLA/Verh) acquisition of the two-way active (shuttle box) avoidance response [1]. Two inbred strains (RHA-I and RLA-I, respectively), derived from those outbred rat lines in 1993, are maintained at the Autonomous University of Barcelona since 1997 [2]. As a result of this selection, clear behavioral differences have been found in both outbred and inbred RHA and RLA rats in a variety of anxiety/fear tests, including the Vogel test, open-field, light–dark box, elevated zero-maze, fear conditioning, hole-board, one-way avoidance and fear-potentiated acoustic startle, among others [3–8]. In addition, some studies have found a greater tendency to novelty seeking and impulsivity in the RHA in comparison to RLA rats [9–11]. Strain/line-based divergences have also been observed in neuroendocrine indexes of anxiety, such as a higher activation of the HPA axis in RLA than RHA rats [see 12 for review], as well as neurochemical and neuroanatomical differences in

brain structures related to fear and anxiety, such as hippocampus, amygdala, cortex, and nucleus accumbens [7,3]. Finally, a recent microarray study has enabled to detect 14 up-regulated and 24 down-regulated genes in RLA-I vs. RHA-I rats. These genes are functionally related to neurological processes, including 5 genes implicated in behavior/brain-related functions that are divergent in Roman rats [13]. This evidence suggests that the Roman rats constitute a valid experimental approach to explore the genetic basis of emotions induced by stressful and anxiety-provoking events.

Recent research conducted in our laboratory suggests that the RHA-I/RLA-I behavioral differences repeatedly obtained in fear/anxiety/stress tests are also observed when they are exposed to experiences of reward loss. The psychological consequences of loss of reinforcement have been systematically studied in the laboratory through the use of animal tests in which the omission or reduction of an expected appetitive reinforcer is used as an aversive event that triggers an emotional arousal reaction called frustration [14,15], disappointment [16] or anxiety [17,18]. These models include instrumental and consummatory successive negative contrast effects (iSNC, cSNC), extinction, the partial reinforcement extinction effect (PREE) and the magnitude of the reinforcement extinction effect (MREE), among others [19]. It was shown that female RLA-I rats exhibited appetitive and aversive iSNC [20,21] and PREE effects that were not observed in RHA-I rats [22]. Moreover, RHA-I animals showed increased

* Corresponding author at: Combatientes de Malvinas 3150 (1428), Buenos Aires, Argentina. Tel.: +54 11 4514 8702 (int.) 170; fax: +54 11 4523 8947.

E-mail address: lucascuenya@yahoo.com.ar (L. Cuenya).

¹ Both authors equally contributed to this work.

resistance to the extinction of an appetitive instrumental response compared to Wistar and RLA-I rats [23]. Finally, when Roman rats were exposed to a consummatory task, RLA-I rats exhibited a longer cSNC effect in comparison to RHA-I rats [24].

The present experiment was designed to study for the first time the performance of the Roman rat strains in an additional reward-loss phenomenon, the partial reinforcement contrast effect (PRCE). It is important to underline here that the PRCE phenomenon has not been compared thus far neither between the Roman rat strains nor between any other pair of psychogenetically selected rat strains differing in their proneness to anxiety or frustration. Successive negative contrast (SNC) refers to a temporary reduction in responding to a smaller reward observed in animals previously exposed to a larger reward, compared to the responding observed in a control group always exposed to the smaller reward [25]. PRCE is defined as a reduced SNC observed after training with partial reinforcement as compared to continuous reinforcement [25,26]. Groups of food-deprived RHA-I and RLA-I animals were exposed to a straight alley where they were partially or continuously reinforced with 12 pellets (contrast groups), or continuously reinforced with 2 pellets (control groups) during the preshift phase. In the postshift phase the reward was downshifted in contrast groups and all the groups received 2 pellets. According to the abovementioned previous results, obtained in different reward loss procedures, it was hypothesized that the more anxious RLA-I rats should show more robust behavioral effects induced by frustration (iSNC and PRCE), than the less anxious RHA-I rats.

2. Material and methods

2.1. Subjects

Thirty-six 90-day-old male rats (18 RHA-I, 18 RLA-I), weighing 320–375 g at the beginning of the experiment, served as subjects. The inbred RHA-I and RLA-I rats are currently bred and reared at the Autonomous University of Barcelona (A.F.-T; A.T.). Animals were housed in pairs in plastic cages and deprived to 80–90% of *ad lib* feeding weight, with free access to water. This level of deprivation was maintained throughout the duration of the experiment by post training supplementary food administered approximately 30 min after the end of the experimental session. Room temperature was kept at about 20 °C. Animals were maintained under a 12-h light/12-h dark cycle with lights on at 8:00 a.m. All testing sessions were performed between 9:00 a.m. and 14:00 p.m. The experiment was carried out according to E.U. guidelines on the use of animals for research (86/609/EU).

2.2. Apparatus

The test apparatus were two identical straight 120 cm × 11 cm × 14 cm runways divided into three sections separated by cardboard guillotine doors. The start sections measured 20 cm, the running sections measured 80 cm; and the goal sections measured 20 cm. The walls and floor of the runways were made of painted wood (green) and two guillotine doors separated the start and goal sections from the running sections when closed. The entire lengths of the runways were covered by clear Plexiglas lids. The food reward was 45-mg pellets (formula P; Research Diets, Inc., Noyes Precision Pellets, Lancaster, NH). Pellets were placed on the floor at the distal end of the goal box. Time to run through the runway was manually registered by using a chronometer. Trials began as soon as the start door was raised, and the chronometer was stopped when the rat entered the goal section with its four paws.

2.3. Procedure

The procedure used was similar to the one previously described by Flaherty et al. [27] and Gómez et al. [22]. Rats were moved from the

colony to an adjacent experimental room in sets of eighteen and in their own home-cages. The floor of the apparatus was vacuumed and wiped down with 5% ethanol solution after every set of rats finished its session. The experiment was conducted in three phases: pretraining, preshift, and postshift phases.

2.3.1. Pretraining

Three habituation days to the apparatus preceded training. On the first day, rats were placed in the start box with both doors open and given five 1-min access periods to the entire runway spaced ≈ 20 min apart. On the following day, rats were given two 2-min access periods, followed by two goal-box feedings (the animal was confined to the goal box and given the appropriate number of pellets) and an additional trial in which the pellets were spread throughout the runway. For the continuous and partial reinforcement groups (HC12-2, HP12-2, LC12-2 and LP12-2) the preshift reward was 12 pellets, and for the control groups (H2-2 and L2-2) the reward was set at 2 pellets (H and L refer to RHA-I and RLA-I strains, and C and P refer to continuous and partial reinforcement, respectively). Each group was composed by 6 animals. The last habituation day consisted of three goal-box feedings spaced ≈ 20 min apart. Subjects were given a maximum of 30 s to consume the food reward and were then removed from the goal box. Twelve Noyes pellets were placed in the home cage 30 min after the third habituation session along with their daily ration of lab chow.

2.3.2. Preshift phase

Training began on the fourth day. Each animal was placed in the start box with the start box door closed and the goal box door opened. The start box door was then opened and the rat was allowed to run down the runway to obtain the food reward. HC12-2 and LC12-2 received 12 pellets in each trial, while HP12-2 and LP12-2 had an unpredictable alternation between reinforced with 12 pellets trials and nonreinforced trials. The sequence of reinforced and nonreinforced trials was randomly arranged by using those Gellermann's sequences [28] with a similar number of RN and NR transitions. Control groups (H2-2 and L2-2) received 2 pellets per trial. A maximum time of 20 s was allowed for the rat to complete the trial. If the rat did not reach the goal box before 20 s had elapsed, it was gently pushed down the runway by the experimenter and 20 s was assigned as the latency for that trial. When the rat reached the goal box, the goal box door was quietly closed by the experimenter and a stopwatch was started. The rat was given a maximum of 30 s to consume the food reward. As soon as the rat had finished eating or 30 s had elapsed, it was removed from the goal box and placed back in its home cage. The rats were kept in the home-cage between trials. Each rat underwent six trials per day/session, and the preshift phase lasted 5 days.

2.3.3. Postshift phase

On the first trial of the postshift phase, the rats receiving 12 pellets (continuous or partial) were shifted to 2 pellets. The rats receiving 2 pellet remained at that level. The postshift phase lasted 6 days, and each daily session was composed by 6 trials.

2.4. Dependent variable

The time (1 s) spent to run from the start section to the goal section of the straight alley was manually recorded and used as dependent variable.

2.5. Statistical analysis

The mean values in each experimental session were subjected to a three factor analysis of variance, with Strain (RLA vs. RHA), Reinforcement (12 pellets continuous vs. 12 pellets partial vs. 2 pellet) and

Session (5 in preshift phase, 6 in postshift phase) as factors, adjusting analysis by Greenhouse–Geisser correction. Separate ANOVAS were conducted for preshift and postshift data, respectively. Where appropriate, post-hoc comparisons were made by using Tukey *post hoc* test. For all statistical analyses, alpha was set at .05.

3. Results

3.1. Preshift phase

A 2 (Strain) \times 3 (Reinforcement) \times 5 (Session) analysis conducted with data from the preshift phase ANOVA found a significant main effect of Session, $F(2.48, 73.43)$: 81.32, $p < .001$, Reinforcement, $F(2, 30)$: 4.17, $p < .03$, and Strain, $F(1, 30)$: 14.63, $p < .01$. The Strain \times Session interaction was also significant, $F(2.44, 73.43)$: 8.88, $p < .001$ (data shown in Fig. 1). No other effect or interaction was significant.

Subsequent analysis conducted to explore the Strain \times Session interaction found that the simple effect of Strain was significant on sessions 1, 2 and 3, smallest $F(1, 30)$: 4.88, $p < .04$, with worse performance in RLA-I than in RHA-I rats. When the strains were separately analyzed, a simple effect of Session was found in both RHA-I, $F(1.83, 27.5)$: 30.99, $p < .001$, and RLA-I animals, $F(2.15, 32.31)$: 52.06, $p < .001$, indicating that, although the running performance was worse in RLA-I rats than in RHA-I rats throughout training, both strains seemed to improve their performance across days.

3.2. Postshift phase

A 2 (Strain) \times 3 (Reinforcement) \times 6 (Session) ANOVA conducted with the postshift data found a significant main effect of Strain, $F(1, 30)$: 24.57, $p < .001$, Reinforcement, $F(2, 30)$: 3.94, $p < .04$, and Session, $F(3.08, 92.48)$: 7.53, $p < .001$. The interactions Reinforcement \times Session, $F(6.16, 92.48)$: 4.42, $p < .001$, Strain \times Session, $F(3.08, 92.48)$: 3.79, $p < .02$, and Reinforcement \times Strain \times Session, $F(6.16, 92.48)$: 2.34, $p < .04$ were also significant (see Fig. 1). In order to explore the source of this triple interaction, the Reinforcement \times Session interaction was analyzed on each strain. This analysis enabled us to separately study the iSNC (12-2C vs. 2-2) and the PRCE (12-2P vs. 12-2C) effects in RHA-I and RLA-I rats, respectively. In RLA-I rats, a main effect of Session, $F(2.72, 40.91)$: 6.09, $p < .01$, and a Session \times Reinforcement interaction were obtained, $F(5.45, 40.91)$: 3.67, $p < .01$. The analysis of this interaction revealed that the simple effect of reinforcement in RLA-I rats was significant on session 2, $F(2, 15)$: 5.46, $p < .02$, and session 3, $F(2, 15)$: 5.44, $p < .02$. Post-hoc comparisons found that, on session 2, LC12-2 rats run significantly slower than LP12-2 animals, $p < .02$, and presented

a tendency to run slower than L2-2 rats, $p < .07$. On session 3, the group LC12-2 showed higher response latencies as compared to the group L2-2, $p < .02$. LP12-2 and L2-2 groups did not significantly differ on these sessions, $ps > .44$. As opposed to the results obtained in RLA-I rats, in RHA-I only a Session effect was obtained, $F(2.62, 39.3)$: 3.26, $p < .04$. These results indicate that the iSNC effect and the PRCE effect were evident in the more emotional RLA-I strain, as opposed to the less emotional RHA-I strain.

4. Discussion

The aim of the present study was to explore for the first time the presence of between-strain (RHA-I vs. RLA-I) differences in the PRCE (partial reinforcement contrast effect), *i.e.* whether the iSNC effect can be attenuated by a chronic experience of frustration induced by partial reinforcement. The results indicated that the iSNC effect was only observed in the more anxious RLA-I strain. Such an effect, *i.e.* the iSNC, was observed in female RLA-I rats in a previous study [20], thus the present iSNC results extend the phenomenon to males of that rat strain. Most importantly for our main objective, the present study provides the first evidence showing that this iSNC effect is not observed when RLA-I animals are previously exposed to a chronic experience of frustration induced by partial reinforcement, which for the first time demonstrates the PRCE phenomenon in the more anxious RLA-I rat strain. That is to say, in frustration-prone (RLA-I) rats, a previous frustrating experience is able to counteract the effects of a new frustrating (iSNC) situation/experience. The demonstration that the PRCE appears only in the RLA-I strain has the importance of completing the picture of that strain as a valid animal model of frustration, as RLA-I rats (but not the RHA-I strain) show a remarkable sensitivity to a wide variety of frustration-related procedures, such as the extinction of an appetitive instrumental learning, the iSNC, the cSNC and the PREE [20,22,23]. By contrast, the PRCE did not appear in the RHA-I strain (similar to what was previously observed in the abovementioned frustration procedures/phenomena), as the latencies of the running response showed by the RHA-I groups during the postshift phase were similar, regardless of the reinforcement schedule (partial vs. continuous) or the amount of reward (12 vs. 2 pellets) received on the preshift phase.

The RHA-RLA performance differences observed during the preshift phase of the present study agree with performance divergences previously obtained in our laboratory using female rats and a similar instrumental runway task, in which SNC, extinction and PREE were induced [23,22,20]. These strain differences consistently appeared regardless of the magnitude of the presented reinforcer (12 pellets, 2 pellets or 1 pellet) and the reinforcement schedule used

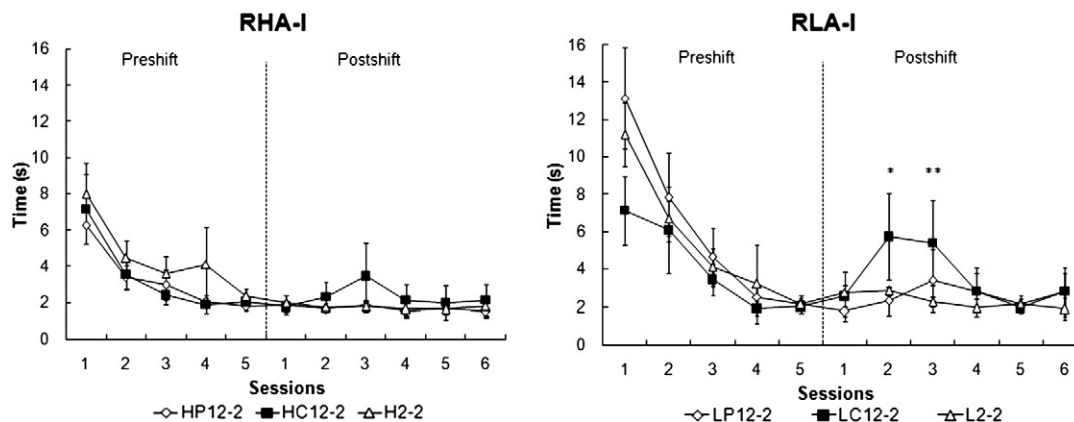


Fig. 1. Mean latency (s) to reach the goal box in RLA-I rats (right panel) and RHA-I rats (left panel) per session, each session was composed by six trials. Bars denote standard error of the mean. *: Low 12-2C vs. low 12-2P. **: Low 12-2C vs. low 2-2. $p < .05$.

(continuous vs. partial). These divergences could be dependent on RHA-I/RLA-I differences observed in the mesolimbic dopaminergic transmission that seem to modulate their response to the reinforcing properties of natural and artificial rewards [see 29 for review].

With regard to the results obtained during the postshift phase, it was observed that the sudden reduction in the amount of reward received by animals (from 12 pellets to 2 pellets) significantly impaired the running response and induced an iSNC effect only in the more anxious RLA-I rats exposed to continuous reinforcement in preshift phase, as opposed to RLA-I rats exposed to partial reinforcement and the less anxious RHA-I animals receiving partial or continuous reinforcement before the reward downshift. These data on iSNC extend to males the results previously reported with female Roman rats and indicate that the between-strain behavioral differences observed in a variety of animal models of anxiety can also be consistently observed in instrumental reward loss situations [20,21,23,24]. According to this view, several lines of evidence have demonstrated that the surprising reduction or omission in the magnitude of an expected reward triggers an aversive emotional response of frustration or disappointment similar to a fear/anxiety state [18]. The results obtained in the present study can be considered as an additional support for this hypothesis, given that the more anxious/fearful RLA-I rats showed an iSNC effect that was not observed in the less anxious/fearful RHA-I animals.

The absence of iSNC effect observed in RLA-I rats exposed to partial reinforcement in the preshift phase, as well as the absence of performance differences between RHA-I and RLA-I rats trained under partial reinforcement can also be discussed within this context. Behavioral persistence that is observed after an experience of partial reinforcement (such as the PREE or the PRCE induced in the present study) refers to the fact that any sort of reward inconsistency tends to induce behavioral persistence [26,30,19,15]. Although several theories have been proposed to account for this effect, most of them have considered that partial reinforced phenomena are closely related to emotional mechanisms [14], given that (i) previous experience of partial reinforcement can increase subsequent behavioral resistance to other frustrative non-reward situations such as the cSNC, this effect being attenuated by the administration of the anxiolytic drug chlordiazepoxide [25] and ethanol [30]; (ii) the lesion of the septohippocampal system abolishes the PREE [31,32]; (iii) the chronic administration of anxiolytic GABAergic compounds in both acquisition and extinction phases tends to decrease persistence in partially reinforced subjects, abolishing the PREE in spaced-trial procedures [see 17,33, for review]; and (iv) differences in extinction resistance after partial reinforcement were obtained in female RLA-I and RHA-I rats, the former showing a PREE that was not observed in the latter. The results obtained in the present study could be considered as an additional support for the emotional nature of the PRCE. Thus, according to the frustration theory proposed by Amsel [14], when a response is nonrewarded in the presence of reward expectancy (as occurring in the nonreinforced trials of the partial reinforcement preshift phase) an aversive internal state of primary frustration is induced. The pairing of initially neutral contextual stimuli with this emotional reaction would enable these stimuli to trigger an expectancy of frustration, called secondary frustration. The occurrence of a reinforced trial in the presence of this secondary frustration would increase the tolerance to frustration through a counterconditioning process, enabling the response persistence observed during the partial reinforcement postshift phase, as opposed to response impairment observed during the continuous reinforcement postshift phase [15,25]. Within this context, it could be hypothesized that RLA-I rats exhibited greater frustration reactions during the nonrewarded trials of the preshift phase, and therefore a stronger counterconditioning of the secondary frustration that could prevent the occurrence of the iSNC during the postshift phase. These emotion-mediated phenomena were absent in the less anxious RHA-I strain, preventing the occurrence of the iSNC and its abolition by partial reinforcement [22].

Although the present results can be explained in terms of between-strain differences in anxiety, alternative explanations cannot be completely ruled out within this context. Firstly, some authors have found evidence suggesting the implication of memory processes, rather than emotional mechanisms, in the reward omission related phenomena [34,35]. From this point of view, it could be argued that the faster running response observed in RHA-I rats in comparison to RLA-I rats could be dependent on higher memory capacities in the former strain with respect to the latter. However, RLA (both outbred and inbred) rats have been shown to be superior to their RHA counterparts in a variety of spatial and working memory tasks [36–38], making difficult to explain the results obtained in the present study on the basis of between-strain cognitive differences. Alternatively, it has been repeatedly found that, as opposed to the freezing response usually observed in RLA-I rats, RHA-I animals tend to show higher levels of locomotor activity and novelty seeking responses when coping with challenging and novel situations [9,10], as well as higher behavioral indexes of impulsivity [11]. Although these divergences could alternatively explain the faster runway behavior observed on RHA-I rats in comparison to the RLA-I rats, previous results obtained in our laboratory indicate that the strain differences observed in the speed of the running response can be abolished by exposing animals to partial reinforcement, as opposed to continuous reinforcement, suggesting the implication of emotional/frustration mechanisms in the between-strain differences observed in this instrumental task [22].

5. Conclusions

In summary, the present results suggest that experiences of frustrative inconsistent reinforcement can reduce subsequent emotional reactions derived from reward downshift. These attenuating effects of frustration seem to be observed only in those organisms particularly reactive to these stressful events (e.g. RLA-I rats as opposed to RHA-I rats), indicating that the individual vulnerability to develop behavioral, emotional and physiological disorders induced by reward loss is modulated by genetic variables.

Acknowledgments

This research was supported by Junta de Andalucía (BIO-302 and HUM-642), Ministerio de Ciencia e Innovación (PSI2010-15787; PSI2009-10532), “Fundació la MARATÓ TV3” (ref. 092630/31), UBACYT 2008 P002, and CONICET.

References

- [1] Driscoll P, Bättig K. Behavioral, emotional and neurochemical profiles of rats selected for extreme differences in active, two-way avoidance performance. In: Lieblisch I, editor. *Genetics of the Brain*. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press; 1982. p. 95–123.
- [2] Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Tobeña A, Langhans W, Bättig P, Driscoll P. Labyrinth exploration, emotional reactivity, and conditioned fear in young Roman/Verh Inbred rats. *Behav Genet* 1997;27(6):573–8.
- [3] Driscoll P, Fernández-Teruel A, Corda MG, Giorgi O, Steimer T. Some guidelines for defining personality differences in rats. In: Yong-Kyu K, editor. *Handbook of behavior genetics*. Springer; 2009. p. 281–300.
- [4] Ferré P, Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Driscoll P, Corda MG, Giorgi O, et al. Behavior of Roman/Verh High- and Low-Avoidance rat lines in anxiety tests: relationship with defecation and self-grooming. *Physiol Behav* 1995;58(6):1209–13.
- [5] López-Aumatell R, Blázquez G, Gil L, Aguilar R, Cañete T, Giménez-Llort L, et al. The Roman High- and Low-Avoidance rat strains differ in fear-potentiated startle and classical aversive conditioning. *Psicothema* 2009;21(1):27–32.
- [6] Torres C, Cándido A, Escarabajal MD, de la Torre L, Maldonado A, Tobeña A, et al. One-way avoidance learning and diazepam in female Roman High- and Roman Low-avoidance rats. *Behav Pharmacol* 2007;8(3):251–3.
- [7] Gómez MJ, Morón I, Torres C, Esteban FJ, de la Torre L, Cándido A, et al. One-way avoidance acquisition and cellular density in the basolateral amygdala: strain differences in Roman high- and low-avoidance rats. *Neurosci Lett* 2009;450(3):317–20.
- [8] Morón I, Gómez MJ, Escarabajal MD, de la Torre L, Cándido A, Maldonado A, et al. One-way avoidance learning in female inbred Roman High- and Low-Avoidance

- rats: effects of bilateral electrolytic central amygdala lesions. *Neurosci Lett* 2010;474(1):32–6.
- [9] Steimer T, Driscoll P. Divergent stress response and coping styles in psychogenetically selected Roman high- (RHA) and low- (RLA) avoidance rats: behavioral, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress* 2003;6(2):87–100.
- [10] Steimer T, Driscoll P. Inter-individual vs. line/strain differences in psychogenetically selected Roman High- (RHA) and Low- (RLA) Avoidance rats: neuroendocrine and behavioral aspects. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;29(1):99–112.
- [11] Moreno M, Cardona D, Gómez MJ, Sánchez-Santed F, Tobeña A, Campa L, et al. Impulsivity characterization in the roman high- and low-avoidance rat strains: behavioral and neurochemical differences. *Neuropsychopharmacology* 2010;35(5):1198–208.
- [12] Carrasco J, Márquez C, Nadal R, Tobeña A, Fernández-Teruel A, Armario A. Characterization of central and peripheral components of the hypothalamus–pituitary–adrenal axis in the inbred Roman rat strains. *Psychoneuroendocrinology* 2008;33(4):437–45.
- [13] Sabariego M, Gómez MJ, Morón I, Torres C, Fernández-Teruel A, Tobeña A, et al. Differential gene expression between inbred Roman high- (RHA-I) and low- (RLA-I) avoidance rats. *Neurosci Lett* 2011;504(3):265–70.
- [14] Amsel A. Précis of frustration theory: an analysis of dispositional learning and memory. *Psychon Bull Rev* 1994;1(3):280–96.
- [15] Papini MR. Role of surprising nonreward in associative learning. *JPN J Anim Psychol* 2006;56(1):35–54.
- [16] Flaherty CF. Incentive relativity. New York: Cambridge University press; 1996.
- [17] Gray JA. The psychology of fear and stress. Cambridge: CUP; 1987.
- [18] Gray JA, McNaughton N. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. Oxford Psychology Series, 2 ed., No. 33. Oxford: Oxford University Press; 2000.
- [19] Papini MR. Comparative psychology of surprising nonreward. *Brain Behav Evol* 2003;62(2):83–95.
- [20] Rosas JM, Callejas-Aguilera JE, Escarabajal MD, Gómez MJ, de la Torre L, Aguero Á, et al. Successive negative contrast effect in instrumental runway behavior: a study with Roman high- (RHA) and Roman low- (RLA) avoidance rats. *Behav Brain Res* 2007;185(1):1–8.
- [21] Torres C, Cándido A, Escarabajal MD, de la Torre L, Maldonado A, Tobeña A, et al. Successive negative contrast effect in one-way avoidance learning in female roman rats. *Physiol Behav* 2005;85(4):377–82.
- [22] Gómez MJ, de la Torre L, Callejas-Aguilera JE, Lerma-Cabrera JM, Rosas JM, Escarabajal MD, et al. The partial reinforcement extinction effect (PREE) in female Roman high- (RHA-I) and low-avoidance (RLA-I) rats. *Behav Brain Res* 2008;194(2):187–92.
- [23] Gómez MJ, de la Torre L, Callejas-Aguilera JE, Rosas JM, Escarabajal MD, Agüero A, et al. Differences in extinction of an appetitive instrumental response in female inbred Roman high- (RHA-I) and low- (RLA-I) avoidance rats. *Psicológica* 2009;30(2):179–86.
- [24] Gómez MJ, Escarabajal MD, de la Torre L, Tobeña A, Fernández-Teruel A, Torres C. Consummatory successive negative and anticipatory contrast effects in inbred Roman rats. *Physiol Behav* 2009;97(3–4):374–80.
- [25] Pellegrini S, Muzio RN, Mustaca AE, Papini MR. Successive negative contrast after partial reinforcement in the consummatory behavior of rats. *Learn Motiv* 2004;35(4):303–21.
- [26] Cuenya L, Fosacheca S, Mustaca AE, Kamenetzky G. Efectos del aislamiento en la adultez sobre el dolor y la frustración. *Psicológica* 2011;32(1):49–63.
- [27] Flaherty CF, Coppotelli C, Hsu D, Otto T. Excitotoxic lesions of the hippocampus disrupt runway but not consummatory contrast. *Behav Brain Res* 1998;93(1–2):1–9.
- [28] Gellermann LW. Chance orders of alternating stimuli in visual discrimination experiments. *J Genet Psychology* 1933;42(1):206–8.
- [29] Giorgi O, Piras G, Corda MG. The psychogenetically selected Roman high and low-avoidance rat lines: a model to study the individual vulnerability to drug addiction. *Neurosci Biobehav Rev* 2007;31(1):148–63.
- [30] Kamenetzky GV, Mustaca AE, Papini MR. An analysis of the anxiolytic effects of ethanol on consummatory successive negative contrast. *Av Psicol Latinoam* 2008;26(2):135–44.
- [31] Henke PG. Effects of reinforcement omission on rats with lesions in the amygdala. *J Comp Physiol Psychol* 1973;48(1):187–93.
- [32] Feldon J, Rawlins JNP, Gray JA. Fornix-fimbria section and the partial reinforcement extinction effect. *Exp Brain Res* 1985;58(3):435–9.
- [33] Leslie JC, Shaw D, McCabe C, Reynolds DS, Dawson GR. Effects of drugs that potentiate GABA on extinction of positively-reinforced operant behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;28(3):229–38.
- [34] Capaldi EJ. Partial reinforcement: a hypothesis of sequential effects. *Psychol Rev* 1966;73(5):459–77.
- [35] Capaldi EJ. The relation between memory and expectancy as revealed percentage and sequence of reward investigations. *Psychon Bull Rev* 1994;1(3):303–10.
- [36] Aguilar R, Escorihuela RM, Gil L, Tobeña A, Fernández-Teruel A. Differences between two psychogenetically selected lines of rats in a swimming pool matching-to-place task: long-term effects of infantile stimulation. *Behav Genet* 2002;32(2):127–34.
- [37] Willig F, M'Harzi M, Bardelay C, Viet D, Delacour J. Roman strains as a psychogenetic model for the study of working memory: behavioral and biochemical data. *Pharmacol, Biochem Behav* 1991;40(1):7–16.
- [38] Willig F, Van de Velde D, Laurent J, M'Harzi M, Delacour J. The Roman strains of rats as a psychogenetic tool for pharmacological investigation of working memory: example with RU 41656. *Psychopharmacology* 1992;107(2–3):415–24.

ANEXO III

Sabariego, M., Gómez, M.J. , Morón, I., Torres, C., Fernández-Teruel, A., Tobeña, A., Cañete, T., Martínez-Conejero, J.A., Horcujadas, J.A., Esteban, F.J. (2011). Differential gene expression between inbred Roman High- (RHA-I) and Low-(RLA-I) Avoidance rats. *Neuroscience Letters*, 504, 265-270.



Differential gene expression between inbred Roman high- (RHA-I) and low- (RLA-I) avoidance rats

Marta Sabariego^{a,1}, M. José Gómez^{a,1}, Ignacio Morón^b, Carmen Torres^{a,*}, Alberto Fernández-Teruel^c, Adolfo Tobeña^c, Toni Cañete^c, José A. Martínez-Conejero^d, José A. Horcajadas^e, Francisco J. Esteban^f

^a Department of Psychology, University of Jaén, Campus Las Lagunillas s/n Building C-5, 23071 Jaén, Spain

^b Department of Psychobiology, Faculty of Psychology, Neuroscience Institute F. Olóriz, University of Granada, Spain

^c Medical Psychology Unit, Department of Psychiatry and Forensic Medicine, Institute of Neurosciences, School of Medicine, Autonomous University of Barcelona, Spain

^d iGenomix, Valencia, Spain

^e Araid Researcher at I+CS, Hospital Miguel Servet, Zaragoza, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla

^f Department of Experimental Biology, Cellular Biology Area and Systems Biology Unit, University of Jaén, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 August 2011

Received in revised form

10 September 2011

Accepted 19 September 2011

Keywords:

Anxiety

Two-way avoidance acquisition

cDNA microarray

RT-PCR

Gene expression

Roman rats

ABSTRACT

Microarray technology was used to explore differences in brain gene expression under basal conditions in two strains of psychogenetically selected rats which differ in anxiety/stress responses, the inbred Roman High-(RHA-I) and Roman Low-(RLA-I) Avoidance rats. Microarray analysis detected 14 up-regulated and 24 down-regulated genes in RLA-I vs. RHA-I rats functionally related to neurobiological processes. The differentially expressed genes CAMKK2, CRHBP, EPHX2, HOMER3, NDN, PRL and RPL6 were selected for microarray validation using qRT-PCR. EPHX2, CAMKK2 (both up-regulated in RLA-I vs. RHA-I rats) and HOMER3 (down-regulated in RLA-I vs. RHA-I rats) showed a similar tendency and fold-change both in microarray and RT-PCR analyses; PRL (up-regulated in RLA-I vs. RHA-I rats), CRHBP and RPL6 (both down-regulated in RLA-I vs. RHA-I animals) showed a similar tendency but a different order of magnitude of change among experiments; finally, NDN was validated neither in tendency nor in magnitude of change.

Published by Elsevier Ireland Ltd.

Microarray technology provides an approach that has made possible to analyze genome-wide gene expression in one single experiment [32]. In the present study, microarray technology was used to explore differences in brain gene expression under basal conditions in two strains of rats selected on the basis of their differences in the acquisition of two-way active avoidance: the inbred Roman High-(RHA-I) and Roman Low-(RLA-I) Avoidance rats (derived from the Swiss sublines RHA/Verh and RLA/Verh). This selection procedure led to stable between-strain divergences related to anxiety/fearfulness and coping style [11].

These differences seem to be related to neuroanatomical [6,20,49], neurochemical and molecular divergences [17,22,33] found in brain regions known to modulate anxiety, impulsiveness, and proneness to substance abuse. The present study dealt with the screening of candidate genes whose differential brain expression could underlie the RHA/RLA differences in fear and anxiety [10].

Female 4-month-old RHA-I ($n=4$) and RLA-I ($n=4$) rats (weight 250–280 g) were used. Animals were housed in pairs with food and water continuously available. Room temperature was kept at about 22 °C. Animals were maintained under a 12-h light/12-h dark cycle with lights on at 8:00 a.m. The experiment was conducted following European Union (EU) guidelines on the use of animals for research (86/609/EEC).

Rats were decapitated and the brains immersed in liquid nitrogen and stored at –80 °C. For RNA isolation, brain tissue was homogenized in a 10-fold volume (w/v) of ice-cold Trizol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). After extraction, total RNA was precipitated by adding isopropanol and centrifuged at 15,000 × g for 12 min. RNA quality was assessed in an A2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

Samples were hybridized onto the Whole Rat Genome Codelink Bioarray (Amersham Biosciences) encompassing more than 55,000 rats DNA probes. The protocols for sample preparation and

Abbreviations: RT-PCR, real-time reverse transcription-polymerase chain reaction; QTL, quantitative trait loci; RNA, ribonucleic acid; cDNA, complementary deoxyribonucleic acid; RHA-I, inbred roman high avoidance rats; RLA-I, inbred roman low avoidance rats; RHA/Verh, outbred swiss roman high avoidance rats; RLA/Verh, outbred swiss roman low avoidance rats; F2, second filial generation; W/V, weight/volume; DEPC, diethylpyrocarbonate; VS, versus; ML, milliliters; NG, nanogram; MMOL, millimole; MMLV, moloney-murine leukaemia virus; FDR, false discory rate; CaMKs, CaM kinases; HR, High responders; LR, Low responders; HPA, hypothalamic-pituitary-adrenal axis.

* Corresponding author. Tel.: +34 953 212292; fax: +34 953 211881.

E-mail address: mctorres@ujaen.es (C. Torres).

¹ These authors contributed equally to this work.

hybridization were adapted from the CodeLink Technical Manual. Total RNAs were prepared from a biological sample and a set of bacterial mRNAs of known concentrations (which are provided by the manufacturers and have complementary sequences to the positive control probes on the Bioarrays). One microgram of total RNA was reverse transcribed into cDNAs and amplified into cRNAs, using *in vitro* transcription. The cRNAs are labelled with avidin, and the fluorescent dye (Cy-5) was bound with streptavidin to the labelled cRNA. Then the labelled cRNAs were hybridized to a CodeLink Bioarray presynthesized. The hybridized microarrays were scanned in a Axon 4100A scanner (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and data extracted with GenePix Pro 6.0 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Total RNA (1 µg) was reverse-transcribed using an Advantage RT-for-PCR kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Each sample was diluted to a final volume of 12.5 ml in diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water, and 1 ml oligo (18-dT) was added, heated at 70 °C for 2 min, and kept on ice until 6.5 ml mastermix–4 ml 5' reaction buffer, 1 ml dNTP mix of 10 mmol each, 0.5 ml recombinant RNase Inhibitor, 1 ul MMLV (Moloney-Murine Leukaemia Virus) reverse transcriptase was added. The reaction was incubated at 42 °C for 1 h, and heated at 94 °C for 5 min to stop cDNA synthesis and destroy DNase activity. The products were diluted to a final volume of 100 ml in DEPC-treated water. Real-time PCR was performed using a LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions on a Roche LightCycler platform (Roche, Göttingen, Germany). We employed 200 ng of cDNA for each analyzed sample. A calibration curve was included in each experiment (five serial dilutions). The final products were analyzed by using the provided software (Roche Molecular Biochemicals LightCycler Software v3.5). Data are presented as the ratio between the expression of the gene vs. that of the human GAPDH gene. Melting curves were analyzed to confirm amplification specificity. The genes CAMKK2, CRHBP, EPHX2, HOMER3, NDN, PRL and RPL6 were used for microarray validation. Forward and reverse primer pair sequences for each gene were (5'–3'): CAMKK2, Fw–GCCCTTCATGGATGAACGAA, Rv – TCCTCTTCGGTCACTCGA; EPHX2, Fw–GGCCCTCTAAACTGGTATCGA, Rv – AGTCTTCAGCCACTTGATGAGA; HOMER3, Fw–CGCTACGAAGAGGAAGTGGGA, Rv – TGTTCCGAGCCAAAGCCTA; NDN, Fw–GTACAAGAGATGTGCTGTGCTA, Rv – CAGTCCAGTTCAAATCAGTCCA; PRL, Fw–CCGGAAGTTCTTTGAACCTGA, Rv – GCAGGGATGGGAGTTGTGA; RPL6, Fw – GAGTTCCTGTGCGTAGGACA, Rv – GCAAATCTGCGAGTCCACA; CHRBP, Fw – CGGGTCCATGAACCAGGAA, Rv – TCCACAAAGTCTCAGTTCCA.

Statistical analysis was carried out using the R software [35] and the appropriate Bioconductor packages [3] run under R. Densitometry values between arrays were normalized using the quantiles normalization function implemented in the Bioconductor limma package. Statistically significant differences were identified using the multitest function implemented in the Bioconductor package (FDR < 0.05). Those genes showing both an absolute fold change (RLA/RHA) value > 1.5, and FDR < 0.05 were considered as significant. Gene symbols, fold-changes and functional annotations were uploaded from Ingenuity Pathways Analysis platform [24].

Using microarray technology and after data normalization and statistical analyses, we detected 14 up-regulated and 24 down-regulated genes in RLA-I vs. RHA-I rats, some of them being related to neurobiological diseases, nervous system development/function and behavior (Table 1). Seven of these genes were selected as candidates for RT-PCR validation. Four of them were those with highest (PRL, EPHX2) and lowest (RPL6, NDN) fold-change, and the other three (CAMKK2, HOMER3, CRHBP) were selected according to their behavior/brain-related functions. The obtained results (Table 2) showed that EPHX2, CAMKK2 and HOMER3 show a similar tendency and fold-change both in microarray and RT-PCR analyses;

PRL, CRHBP and RPL6 showed a similar tendency but a different order of magnitude of change among experiments; finally, NDN was neither validated in tendency nor in magnitude of change (see Table 3).

In order to ascertain the possible implication of the differentially expressed genes in common functions and diseases, a gene enrichment functional analysis was further carried out. 18 genes were related to the category “Neurological Diseases”, 8 to “Nervous System Development and Function” and 5 to “Behavior”, which point to a manifested de-regulation of cerebral related molecules (Table 2).

The five genes validated through RT-PCR seem to be linked to behavioral/neuroendocrine traits shown to be divergent between Roman rats (i.e. fearfulness, novelty seeking, impulsivity and vulnerability to drug abuse; see also Table 3): EPHX2, PRL, CAMKK2 (up-regulated in RLA-I vs. RHA-I rats), CRHBP and HOMER3 (down-regulated in RLA-I vs. RHA-I animals). EPHX2 gene encodes a member of the epoxide hydrolase protein family [40]. A knockout EPHX2 mouse [29] has shown decreased plasma testosterone and cholesterol levels, reduced novelty-induced exploratory behavior and a decreased hedonic response. This suggests a putative role of EPHX2 gene in the regulation of responses (fearfulness and hedonism) that are divergent in Roman rats ([11], see Table 3).

An important body of evidence indicates that anxiogenic/stressful stimuli activate prolactin-releasing peptide neurons that regulate prolactin levels in several brain areas (see [34], for review), and that prolactin involvement in anxiety and stress seems to vary with the particular type of stress [36,42,48], the amount of control an organism exerts over the stressor [42,44], and the animal's behavioral phenotype [27]. It is therefore all the more remarkable that the Roman rats exhibit large between-line/strain differences in stress-induced prolactin responses, which are particularly exacerbated in the RLA line/strain [41,42], as well as in other strains of rats selectively bred for high anxiety-related behavior [27]. The finding that prolactin gene expression is markedly upregulated in RLA-I, compared to RHA-I rats, seems to be in line with these results and points to prolactin function as one of the most between-line/strain discriminating neuroendocrine traits linked to their psychogenetic profiles ([7], see Table 3).

CaM kinases constitute a family of protein kinases whose activities are modulated by binding Ca²⁺/calmodulin. CaMKII, in particular, is known to modulate neuronal development, synaptic plasticity (i.e. long term potentiation and depression; see [47] for review) and aversive learning/memory [1,12,21,38]. Within this context, Mei et al. [31] found that CaMKII gene expression was downregulated in the hippocampus 6 h after fear conditioning. Kabbaj et al. [25] conducted a study with Sprague-Dawley rats and selected those animals showing high (HR) vs. low rates (LR) of novelty-induced exploratory locomotion, reporting that social defeat increased CAMKII mRNA expression in hippocampus of LR rats only. These results suggest the involvement of CAMKII in both aversive learning/memory and stressful experiences. Interestingly, it is well known that RHA-I and RLA-I exhibit a clearly different pattern of responses when exposed to unconditioned and conditioned anxiety/fear-related stimuli/tasks (e.g. [11,28], see Table 3).

The CRHBP gene encodes the corticotropin-releasing factor-binding protein. This protein seems to be related to anxiety, stress and depression [8,45]. In mice, CRHBP expression levels are high in the pituitary, cortex, hippocampus, amygdala and bed nucleus of the stria terminalis, among other areas [39]. CRHBP appears to modulate the neuroendocrine activity of CRH (corticotropin releasing hormone), which has been recognized as one of the major hypophysiotropic (HPA-axis) hormones involved in the regulation of the mammalian behavioral and endocrine/immunological responses to stress [45]. Accordingly, it has been reported that:

Table 1
Gene names and description.

Symbol	Description	RefSeq	Microarray RLA/RHA	RT-PCR
PRL	Prolactin	NM.012629	65.3	390.3
EPHX2	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	NM.022936	8.5	8.9
SNCG	synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1)	NM.031688	3.9	
CGA	glycoprotein hormones, alpha polypeptide	NM.053918	3.8	
PTPRJ	protein tyrosine phosphatase, receptor type, J	NM.017269	2.27	
MYO16	myosin XVI	NM.138893	2.1	
CAMKK2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta	NM.031338	1.9	1.2
PROKR1	prokineticin receptor 1	NM.138977	1.9	
PEX11A	peroxisomal biogenesis factor 11 alpha	NM.053487	1.8	
KCNQ3	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 3	NM.031597	1.7	
CCL6	chemokine (C-C motif) ligand 6	NM.001004202	1.6	
ACAA2	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2	NM.130433	1.6	
ADAM2	ADAM metalloproteinase domain 2	NM.020077	1.5	
INSR	insulin receptor	NM.017071	1.5	
SFRS12	splicing factor, arginine/serine-rich 12	NM.020092	−1.5	
GPD1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	NM.022215	−1.5	
HOMER3	homer homolog 3 (Drosophila)	NM.053310	−1.5	−2.1
MPP4	membrane protein, palmitoylated 4 (MAGUK p55 subfamily member 4)	NM.021265	−1.6	
EXOC8	exocyst complex component 8	NM.139043	−1.7	
LRAT	lecithin retinol acyltransferase (phosphatidylcholine-retinol O-acyltransferase)	NM.022280	−1.7	
MAN2C1	mannosidase, alpha, class 2 C, member 1	NM.139256	−1.7	
MGP	matrix Gla protein	NM.012862	−1.8	
AMHR2	anti-Mullerian hormone receptor, type II	NM.030998	−1.8	
NEUROD1	neurogenic differentiation 1	NM.019218	−1.8	
GIF	gastric intrinsic factor (vitamin B synthesis)	NM.017162	−1.8	
SLC28A2	solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 2	NM.031664	−2.2	
SORBS2	sorbin and SH3 domain containing 2	NM.053770	−2.2	
IRF3	interferon regulatory factor 3	NM.001006969	−2.3	
SLC9A1	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 1	NM.012652	−2.6	
PRG2	proteoglycan 2, bone marrow (natural killer cell activator, eosinophil granule major basic protein)	NM.031619	−2.8	
MECR	mitochondrial trans-2-enoyl-CoA reductase	NM.017209	−3.0	
PHKG1	phosphorylase kinase, gamma 1 (muscle)	NM.031573	−3.5	
FTH1	ferritin, heavy polypeptide 1	NM.012848	−5.6	
DAD1	defender against cell death 1	NM.138910	−5.7	
CRHBP	corticotropin releasing hormone binding protein	NM.139183	−12.2	−2.0
MOBK13	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 3 (yeast)	NM.133528	−16.7	
RPL6	ribosomal protein L6	NM.053971	−26.2	−1.4
NDN	necdin homolog (mouse)	NM.001008558	−124.8	1.1

(i) rats showed a 2–3 fold increases in pituitary CRHBP mRNA levels 30–120 min after the initiation of restraint stress, whereas adrenalectomy prevented this increase [30], and (ii) CRHBP mRNA expression is increased in the basolateral amygdala after acute stress and remains elevated for up to 21 h after the application of the stressor [23]. Somewhat controversially, pituitary CRHBP over-expressing mice have shown a relatively “anxiolytic” behavioral profile, while CRHBP-deficient mice displayed relatively “anxious” responses in the elevated plus-maze test and other tests of unconditioned anxiety [5,26]. These apparently controversial results have led to the suggestion that increased CRHBP levels in response to stress may provide a feedback mechanism to maintain homeostasis of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis [30,45]. The fact that CRHBP mRNA expression is downregulated in the more stress-prone RLA-I strain, compared to the RHA-I strain, could indicate a deficient function of CRHBP with respect to the negative modulation of the HPA axis, a hypothesis that deserves further investigation (see [6] and Table 3).

Finally, the HOMER3 gene encodes a member of the homer family of dendritic proteins, some of which regulate group 1 metabotropic glutamate receptor and glutamatergic synaptic plasticity [14]. These proteins have been involved in brain processes related to drug seeking behavior and neuropsychiatric disorders [43]. As there is evidence suggesting that the Roman rat lines/strains differ in glutamate neurotransmission [19,22], while they clearly diverge in vulnerability to addiction [15,19]

and impulsivity/novelty seeking (reviewed by [33]), the observed differential between-strain HOMER3 expression deserves further in-depth studies.

The present findings suggest that phenotypic RHA-I/RLA-I differences are accompanied by basal differences in gene expression of molecules related to fear, stress, anxiety and novelty seeking responses/behavior. Our results should be considered with caution because whole brain samples have been used. In this sense, we should underline the fact that we preferred to evaluate differential gene expression from whole brain samples, rather than from specific brain areas, because this was an initial, hypothesis generating exploratory study with the RHA-I/RLA-I rats. Thus, we expected to find some important (candidate) genes differing between the strains which could be related to some of the well-known strain-related phenotypic profiles and could provide us with relevant clues as to what specific brain areas we should address in future studies. In fact, we report here that some genes with known function (according to many previous studies) likely related to the differential RHA-I/RLA-I phenotypes (see Table 3) show differential expression in a hypothetically correct direction. This is the case, for instance (see also Table 3), of the PRL and CRHBP genes, which are overexpressed and underexpressed, respectively, in the brain of the more stress-prone RLA-I strain [6,41,42]. These results indicate that both genes and the related “hippocampus-amygdala-bed nucleus (stria terminalis)-hypothalamic” systems deserve deeper studies in the Roman rat strains. Importantly, our study also lends

Table 2
RT-PCR validation [24].

Function and disease category	Molecules	Number of molecules
Neurological disease	EPHX2, MGP, CGA, SLC9A1, IRF3, KCNQ3, CAMKK2, CRHBP, FTH1, GPD1, INSR, LRAT, MYO16, NDN, NEUROD1, PRL, SNCG, SORBS2	18
Cell cycle	INSR, NEUROD1, NDN, CGA, PRL, CGA, FTH1, IRF3, PRG2, SLC9A1, PROKR1, MGP, SNCG, SORBS2	14
Cellular growth and proliferation	CAMKK2, NEUROD1, PRL, FTH1, INSR, CGA, NDN, MGP, PTPRJ, SLC9A1, SNCG, INSR	12
Small molecule biochemistry	INSR, PRL, LRAT, EPHX2, SLC28A2, FTH1, CGA, ACAA2, MECR, NEUROD1, SLC9A1, GPD1	12
Cellular movement	PRL, SNCG, CGA, CAMKK2, INSR, MGP, NDN, NEUROD1, PRL, PTPRJ	10
Cell morphology	MGP, PRL, PROKR1, NEUROD1, SORBS2, SLC9A1, INSR, LRAT, SNCG	9
Nervous system development and function	CAMKK2, NEUROD1, SLC9A1, PRL, EPHX2, NDN, INSR, CGA	8
Molecular transport	EPHX2, SLC28A2, FTH1, LRAT, SLC9A1, CGA, PRL, INSR	8
Lipid metabolism	LRAT, EPHX2, ACAA2, MECR, CGA, PRL, INSR	7
Organ development, Cellular development	CGA, PTPRJ, NEUROD1, AMHR2, INSR, PRL, MGP	7
Genetic disorder	INSR, NEUROD1, PRL, NDN, MGP, FTH1, INSR	7
Nucleic acid metabolism	SLC9A1, INSR, KCNQ3, AMHR2, GIF, EPHX2, IRF3	7
Carbohydrate metabolism	SLC28A2, CGA, INSR, PRL, ACAA2, MECR, GPD1	7
Embryonic development	GPD1, INSR, LRAT, NEUROD1, PHKG1, PRL	6
Endocrine system development and function	AMHR2, NEUROD1, INSR, DAD1, LRAT, CAMKK2	6
Cardiovascular disease	NEUROD1, PRL, CGA, NEUROD1, SLC9A1, INSR	6
Cell-to-cell signaling and interaction	SLC9A1, EPHX2, IRF3, MGP, INSR, PROKR1	6
Cellular assembly and organization	SLC9A1, ADAM2, INSR, NEUROD1, PRL, ADAM2	6
Metabolic disease	LRAT, NEUROD1, ADAM2, PEX11A, PRL, SORBS2	6
Organismal development	INSR, SLC9A1, GIF, GPD1, EPHX2, NEUROD1	6
Behavior	NEUROD1, CGA, CRHBP, DAD1, INSR, LRAT	6
Reproductive system development and function	EPHX2, NDN, CGA, ADAM2, CRHBP	5
Cancer	CGA, PRL, INSR, ADAM2, AMHR2	5
Endocrine system disorders	CGA, INSR, PRL, FTH1, SORBS2	5
Drug metabolism	CGA, INSR, GPD1, NEUROD1, PRL	5
DNA replication, recombination, and repair	SLC28A2, FTH1, PRL, CGA, PRL	5
Cardiovascular system development and function	CGA, INSR, PRL, FTH1, GPD1	5
	MGP, PRL, SLC9A1, INSR, PROKR1	5

further support to Castanon et al. [7], who suggested that prolactin was the main neuroendocrine factor which remains correlated with two-way avoidance acquisition in segregating crosses of the Roman rats.

CAMKK2 and HOMER3 genes are also worth mentioning as (i) the former is involved in unconditioned aversive responses and in hippocampus-dependent aversive learning (see above), while the latter is involved in drug-seeking behavior and other neuropsychiatric disorders, and (ii) all these processes/responses are markedly

different between the Roman rat strains/lines (see [11], and also Table 3). Thus CAMKK2 and HOMER3 will also be leading candidates for investigation in the hippocampal (and limbic) system of the Roman rat strains with regard to their divergencies in aversive responses and drug-seeking-related profiles [11,15,19].

None of the present differentially expressed genes are coincident with those found by Zhang et al. [50] in their microarray study with SHA and SLA rat lines (also psychogenetically selected by their extreme high or low ability for two-way avoidance acquisition and

Table 3
Summary of relevant phenotypic differences between the Roman (RHA and RLA) rat outbred lines (RHA and RLA) or inbred strains (RHA-I and RLA-I), and hypothetic relationships with the differentially expressed genes in the present study.

Divergent phenotype between RHA and RLA lines/strains	Line/strain differences	Examples of relevant references	Genes, differentially expressed in the present study, which are possibly related to the phenotypes
* Baseline testosterone levels	RLA > RHA	[42]	EPHX2
* Limbic/hypothalamic ratio of testosterone metabolism	RLA < RHA	[42]	EPHX2
* Open-field activity/exploration (novelty-induced exploration in various tests)	RLA < RHA and RLA-I < RHA-I	[11,13,41]	EPHX2
* Saccharin preference	RLA < RHA	[16,37]	EPHX2
* Stress-induced prolactin response	RLA > RHA	[18,41,42]	PRL
	RLA-I > RHA-I	[7,9]	
* Passive coping responses (e.g. self-grooming, freezing) under exposure to novelty	RLA-I > RHA-I	[13]	CAMKK2
	RLA > RHA and RLA-I > RHA-I	[41]	
* Classical fear conditioning (freezing) and fear-potentiated startle	RLA-I > RHA-I	[28,49]	CAMMK2
* Stress-induced (CRH-dependent) HPA-axis hormonal responses	RLA > RHA	[2,7,18,41,42,46]	CRHBP
	RLA-I > RHA-I	[6,9,11]	
* CRH receptors in hypothalamus and BNST	RLA-I > RHA-I	[6]	CRHBP
* Novelty-seeking behavior	RHA > RLA	[16,13]	HOMER3
	RHA-I > RLA-I		
* Ethanol and cocaine-seeking behavior	RHA > RLA	[15,16,19,37]	HOMER3
* Impulsivity behavior and attention deficits	RHA-I > RLA-I	[33]	HOMER3

(**) These unpublished (submitted) results show that ACTH, corticosterone and prolactin responses to stress are significantly and markedly higher in RLA-I as compared with RHA-I rats. BNST, bed nucleus of the stria terminalis.

showing differences in anxiety similar to those of the Roman rats lines/strains; [4]). Besides the fact that their study was performed only in hippocampal samples, comparing the Zhang et al. study with the present one it has to be taken into account that: (i) the Roman rat lines/strains differ, as mentioned above, not only in anxiety/fearfulness and stress sensitivity, but also in novelty seeking, impulsivity and drug-seeking behavior; and (ii), different genetic routes can yield the same or similar phenotypes (or phenotype clusters/dimensions).

Further QTL studies that extend previous results [17], as well as area-specific microarray studies in the Roman rats will have to be performed in order to extend our understanding of the genetic basis of their strain-divergent behavioral traits and their possible relevance for human neuropsychiatric disorders.

Acknowledgements

This research was supported by Junta de Andalucía (BIO-302 to FJE), Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spanish grants to (SEJ2004-03231/PSIC and PSI2010-15787 to CT), (PSI2009-10532 to AF-T and AT), “Fundació la MARATÓ TV3” (ref. 092630/31), by the DGR (2009 SGR-51) and through EURATRANS European project (grant agreement HEALTH-F4-2010-241504). The authors thank María Ruiz for technical assistance.

References

- [1] C.M. Atkins, J.C. Selcher, J.J. Petraitis, J.M. Trzaskos, J.D. Sweatt, The MAPK cascade is required for mammalian associative learning, *Nat. Neurosci.* 1 (1998) 602–609.
- [2] J.M. Aubry, V. Bartanusz, P. Driscoll, P. Schulz, T. Steimer, J.Z. Kiss, Corticotropin-releasing factor and vasopressin messenger-RNA levels in Roman high-avoidance and low-avoidance rats—response to open field exposure, *Neuroendocrinology* 61 (1995) 89–97.
- [3] Bioconductor [<http://www.bioconductor.org/>] 2/08/2011.
- [4] F.R. Brush, Selection for differences in avoidance learning: the syracuse strains differ in anxiety, not learning ability, *Behav. Genet.* 33 (2003) 677–696.
- [5] H.L. Burrows, M. Nakajima, J.S. Lesh, K.A. Goosens, L.C. Samuelson, A. Inui, S.A. Camper, A.F. Seasholtz, Excess corticotropin-releasing hormone-binding protein in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in transgenic mice, *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 1–9.
- [6] J. Carrasco, C. Márquez, R. Nadal, A. Tobeña, A. Fernández-Teruel, A. Armario, Characterization of central and peripheral components of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in the inbred Roman rat strains, *Psychoneuroendocrinology* 33 (2008) 437–445.
- [7] N. Castanon, F. Pérez-Díaz, P. Mormede, Genetic analysis of the relationship between behavioral and neuroendocrine traits in Roman high and low avoidance rat lines, *Behav. Genet.* 25 (1995) 371–383.
- [8] S. Claes, S. Villafuerte, T. Forsgren, S. Sluijs, J. Del-Favero, R. Adolfsson, C. Van Broeckhoven, The corticotropin-releasing hormone binding protein is associated with major depression in a population from Northern Sweden, *Biol. Psychiatry* 54 (2003) 867–872.
- [9] S. Diaz-Moran, M. Palencia, C. Mont-Cardona, T. Cañete, G. Blázquez, E. Martínez-Membrives, Coping style and stress hormone responses in genetically heterogeneous N/Nih-HS rats: comparison with the Roman rat strains, *Behav. Brain Res.*, accepted for publication.
- [10] P. Driscoll, R.M. Escorihuela, A. Fernández-Teruel, O. Giorgi, H. Schwegler, T. Steimer, A. Wiersma, M.G. Corda, J. Flint, J.M. Koolhaas, W. Langhans, P.E. Schulz, J. Siegel, A. Tobeña, Genetic selection and differential stress responses. The roman lines/strains of rats, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 851 (1998) 521–530.
- [11] P. Driscoll, A. Fernández-Teruel, M.G. Corda, O. Giorgi, T. Steimer, Some guidelines for defining personality differences in rats, in: Y.K. Kim (Ed.), *Handbook of Behavior Genetics*, Springer, New York, 2009, pp. 281–300.
- [12] J. Du, S.T. Szabo, N.A. Gray, H.K. Manji, Focus on CaMKII a molecular switch in the pathophysiology and treatment of mood and anxiety disorders, *Int. J. Neuropsychopharmacology* 7 (2004) 243–248.
- [13] R.M. Escorihuela, A. Fernández-Teruel, L. Gil, R. Aguilar, A. Tobeña, P. Driscoll, Inbred Roman high- and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviors, *Physiol. Behav.* 67 (1999) 19–26.
- [14] L. Fagni, F. Ango, J. Perroy, J. Bockaert, Identification and functional roles of metabotropic glutamate receptor-interacting proteins, *Semin. Cell. Dev. Biol.* 15 (2004) 289–298.
- [15] L. Fattore, G. Piras, M.G. Corda, O. Giorgi, The Roman high- and low-avoidance rat lines differ in the acquisition, maintenance, extinction, and reinstatement of intravenous cocaine self-administration, *Neuropsychopharmacology* 34 (2009) 1091–1101.
- [16] A. Fernández-Teruel, P. Driscoll, L. Gil, R. Aguilar, A. Tobeña, R.M. Escorihuela, Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking, saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh and RLA/Verh) differing in incentive-seeking behavior, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73 (2002) 225–231.
- [17] A. Fernández-Teruel, R.M. Escorihuela, J.A. Gray, R. Aguilar, L. Gil, L. Giménez-Llort, A. Tobeña, A. Bhomra, A. Nicod, R. Mott, P. Driscoll, G.R. Dawson, J. Flint, A quantitative trait locus influencing anxiety in the laboratory rat, *Genome Res.* 12 (2002) 618–626.
- [18] C. Gentsch, M. Lichtsteiner, P. Driscoll, H. Feer, Differential hormonal and physiological responses to stress in roman high- and low-avoidance rats, *Physiol. Behav.* 28 (1982) 259–263.
- [19] O. Giorgi, G. Piras, M.G. Corda, The psychogenetically selected Roman high- and low-avoidance rat lines: a model to study the individual vulnerability to drug addiction, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31 (2007) 148–163.
- [20] M.J. Gómez, I. Morón, C. Torres, F. Esteban, L. de la Torre, A. Cándido, A. Maldonado, A. Fernández-Teruel, A. Tobeña, M.D. Escarabajal, One-way avoidance acquisition and cellular density in the basolateral amygdala: strain differences in Roman high- and low-avoidance rats, *Neurosci. Lett.* 450 (2009) 317–320.
- [21] L.C. Griffith, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: an unforgettable kinase, *J. Neurosci.* 24 (2004) 8391–8393.
- [22] M. Guitart-Masip, B. Johansson, T. Cañete, A. Fernández-Teruel, A. Tobeña, L. Terenius, L. Giménez-Llort, Regional adaptations in PSD-95, NGFI-A and secretogranin gene transcripts related to vulnerability to behavioral sensitization to amphetamine in the Roman rat strains, *Neuroscience* 151 (2008) 195–208.
- [23] R.J. Herringa, S.A. Nanda, D.T. Hsu, P.H. Roseboom, N.H. Kalin, The effects of acute stress on the regulation of central and basolateral amygdala CRF-binding protein gene expression, *Mol. Brain Res.* 131 (2004) 17–25.
- [24] Ingenuity Pathways Analysis platform [<http://www.ingenuity.com/>] 22/07/2011.
- [25] M. Kabbaj, S. Evans, S.J. Watson, H. Akil, The search for neurobiological basis of vulnerability to drug abuse: using microarray to investigate the role of stress and individual differences, *Neuropharmacology* 47 (2004) 111–122.
- [26] I.J. Karolyi, H.L. Burrows, T.M. Ramesh, M. Nakajima, J.S. Lesh, E. Seong, S.A. Camper, A.F. Seasholtz, Altered anxiety and weight gain in CRH-binding protein-deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 11595–11600.
- [27] R. Landgraf, A. Wigger, F. Holsboer, I.D. Neumann, Hyper-reactive hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in rats bred for high anxiety-related behavior, *J. Neuroendocrinol.* 11 (1999) 405–407.
- [28] R. López-Aumatell, G. Blázquez, L. Gil, R. Aguilar, T. Cañete, L. Giménez-Llort, A. Tobeña, A. Fernández-Teruel, The Roman high- and low-avoidance rat strains differ in fear-potentiated startle and classical aversive conditioning, *Psicothema* 21 (2009) 27–32.
- [29] A. Luria, C. Morisseau, H.J. Tsai, J. Yang, B. Inceoglu, B. De Taeye, S.M. Watkins, M.M. Wiest, J.B. German, B.D. Hammock, Alteration in plasma testosterone levels in male mice lacking soluble epoxide hydrolase, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297 (2009) E375–E383.
- [30] S.J. McClennen, D.N. Cortright, A.F. Seasholtz, Regulation of pituitary corticotropin-releasing hormone-binding protein messenger ribonucleic acid levels by restraint stress and adrenalectomy, *Endocrinology* 139 (1998) 4435–4441.
- [31] B. Mei, L. Chuxia, S. Dong, C.H. Jiang, H. Wang, Y. Hu, Distinct gene expression profiles in hippocampus and amygdala after fear conditioning, *Brain Res. Bull.* 67 (2005) 1–12.
- [32] M.F. Miles, R.W. Williams, Meta-analysis for microarray studies of the genetics of complex traits, *Trends Biotechnol.* 25 (2007) 45–47.
- [33] M. Moreno, D. Cardona, M.J. Gómez, F. Sánchez-Santed, A. Tobeña, A. Fernández-Teruel, A. Campa, C. Suñol, M.D. Escarabajal, C. Torres, P. Flores, Impulsivity characterization in the Roman high- and low-avoidance rat strains: behavioral and neurochemical differences, *Neuropsychopharmacology* 1 (2010) 1–11.
- [34] T. Onaka, Y. Takayanagi, G. Leng, Metabolic and stress-related roles of prolactin-releasing peptide, *Trends. Endocrinol. Metab.* 21 (2010) 287–293.
- [35] R software [<http://www.r-project.org/>] 02/08/2011.
- [36] A. Ratner, D.B. Yelvington, M. Rosenthal, Prolactin and corticosterone response to repeated footshock stress in male rats, *Psychoneuroendocrinology* 14 (1989) 393–396.
- [37] R. Razafimanalina, P. Mormède, L. Velley, Gustatory preference-aversion profiles for saccharin, quinine and alcohol in Roman high- and low-avoidance lines, *Behav. Pharmacol.* 7 (1996) 78–84.
- [38] S.M. Rodrigues, C.R. Farb, E.P. Bauer, J.E. LeDoux, G.E. Schafe, Pavlovian conditioning regulates Thr286 autophosphorylation of Ca_v2/calmodulin-dependent protein kinase II at lateral amygdala synapses, *J. Neurosci.* 24 (2004) 3281–3288.
- [39] A.F. Seasholtz, H.L. Burrows, I.J. Karolyi, S.A. Camper, Mouse models of altered CRH-binding protein expression, *Peptides* 22 (2001) 743–751.
- [40] A.A. Spector, Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway, *J. Lipid Res.* 50 (Suppl.) (2009) S52–S56.
- [41] T. Steimer, P. Driscoll, Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: neuroendocrine and behavioural aspects, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29 (2005) 99–112.
- [42] T. Steimer, S. la Fleur, P.E. Schulz, Neuroendocrine correlates of emotional reactivity and coping in male rats from the Roman high (RHA/Verh)- and low (RLA/Verh)-avoidance lines, *Behav. Genet.* 27 (1997).
- [43] K. Szumlinski, A.W. Ary, K.D. Lominac, Homers regulate drug-induced neuroplasticity: implications for addiction, *Biochem. Pharmacol.* 75 (2008) 112–133.
- [44] J.I. Telner, Z. Merali, R.L. Singhal, Stress controllability and plasma prolactin levels in the rat, *Psychoneuroendocrinology* 7 (1982) 361–364.

- [45] F. Van Den Eede, F.C. Van Broeckhoven, S.J. Claes, Corticotropin-releasing factor-binding protein, stress and major depression, *Ageing Res.* 4 (2005) 213–239.
- [46] C.D. Walker, R.W. Rivest, M.J. Meaney, M.L. Aubert, Differential activation of the pituitary-adrenocortical axis after stress in the rat: use of two genetically selected lines (Roman low- and high-avoidance rats) as a model, *J. Endocrinol.* 123 (1989) 477–485.
- [47] G.A. Wayman, Y.S. Lee, H. Tokumitsu, A. Silva, T.R. Soderling, Calmodulin-kinases. Modulators of neuronal development and plasticity, *Neuron* 59 (2008) 914–931.
- [48] D.B. Yelvington, G.K. Weiss, A. Ratner, Habituation of the prolactin response in rats to psychological stress, *Psychoneuroendocrinology* 10 (1985) 95–102.
- [49] D.M. Yilmazer-Hanke, H. Faber-Zuschratter, R. Linke, H. Schwegler, Contribution of amygdala neurons containing peptides and calcium-binding proteins to fear-potentiated startle and exploration-related anxiety in inbred Roman high- and low-avoidance rats, *Eur. J. Neurosci.* 15 (2002) 1206–1218.
- [50] S. Zhang, T. Amstein, J. Shen, F.R. Brush, H.K. Gershenfeld, Molecular correlates of emotional learning using genetically selected rat lines, *Genes Brain Behav.* 4 (2005) 99–109.

ANEXO IV

Sabariego, M, Morón, I., Gómez, M.J., Donaire, R., Tobeña, A., Fernández-Teruel, A.,
Martínez-Conejero, J.A., Esteban, F.J., Torres, C. (submitted). Incentive loss and
hippocampal gene expression in inbred Roman high- (RHA-I) and romanlow- (RLA-I)
avoidance rats. Enviado a *Behavioural Brain Research*.

**INCENTIVE LOSS AND HIPPOCAMPAL GENE EXPRESSION IN INBRED
ROMAN HIGH- (RHA-I) AND ROMAN LOW- (RLA-I) AVOIDANCE RATS**

**Marta Sabariego¹, Ignacio Morón², M^a José Gómez¹, Rocío Donaire¹, Adolf
Tobeña³, Alberto Fernández-Teruel³, José A. Martínez-Conejero⁴, Francisco J.
Esteban⁵, Carmen Torres¹**

¹Department of Psychology, University of Jaén, Spain

²Department of Psychobiology at the Center for Mind, Brain and Behavior Research.
University of Granada, Granada, Spain

³Medical Psychology Unit, Department of Psychiatry and Forensic Medicine, Institute
of Neurosciences, School of Medicine, Autonomous University of Barcelona, Spain

⁴iGenomix, Valencia, Spain

⁵Department of Experimental Biology, Cellular Biology Area and Systems Biology
Unit, University of Jaén, Spain

§Corresponding author:

Marta Sabariego Almazán

Department of Psychology

University of Jaén

Campus Lagunillas s/n, Building C-5, office number 120

23071 Jaén (Spain)

Phone: +34 953212292

Fax: +34953211881

e-mail: m.sabariegoalmazan@gmail.com

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Junta de Andalucía (Grants HUM-642 and BIO-302), Generalitat de Catalunya (Grant 2009SGR-0051), Ministerio de Ciencia e Innovación (Grants PSI2010-15787 and PSI2009-10532), and Fundació la MARATÓ TV3 (Grant 092630/31).

ABSTRACT

Two recent microarray and qRT-PCR studies conducted under basal conditions showed that inbred Roman High- (RHA-I, low emotional reactivity) and Low-Avoidance (RLA-I, high emotional reactivity) rats (derived from outbred rats and selected and bred on the basis of their divergence in two-way avoidance performance) differed in whole-brain and hippocampal expression of genes related to neurotransmission, emotion, stress, aversive learning, and drug seeking behavior. The present experiment extended these studies by analyzing strain differences in hippocampal gene expression after an aversive experience involving reward downshift: instrumental successive negative contrast (iSNC). Food-deprived Roman male rats were exposed to a reduction in the amount of solid food presented in the goal of a straight alley (from 12 pellets in preshift trials to 2 pellets in postshift trials). The iSNC effect appeared only in RLA- I rats (higher response latencies in the 12-2 group as compared to the 2-2 control group in postshift trials). Two and a half hours after this behavioral test, hippocampi were removed and prepared for microarray analysis. Samples were hybridized onto the Whole Rat Genome Codelink Bioarray (Amershan Biosciences) and data processed following conventional statistical and computational procedures. Four genes, further validated by qRT-PCR, have relevance for brain function and behavior (TAAR2, THAP1, PKD2L1, NANOS), including schizophrenia, depression, anxiety, and drug addiction, thus showing the usefulness of Roman strains for neurogenetic research.

Keywords: Roman rats; emotional reactivity; frustration; cDNA microarray; RT-PCR; gene expression; hippocampus

1. INTRODUCTION

The significance of anxiety in health and disease is well recognized today, but its underlying genetic and molecular mechanisms are still poorly understood [1]. A major source of anxiety relates to incentive loss, including the loss of a spouse and unemployment [2]. Animal models of incentive loss can provide a basis to understand molecular and genetic processes triggered by such experiences. Some of the most common paradigms include appetitive extinction [3], the partial reinforcement extinction effect [4], and the successive negative contrast (SNC) effect [5]. SNC is defined as a temporary reduction in responding to a smaller reward observed in animals previously exposed to a larger reward, compared to the responding registered in a control group always exposed to the smaller reward [4]. The basic effect can be obtained by using solid or liquid food [6], by reducing the palatability of a familiar food source [7], and also by reducing either the quantity or the quality of the reward [8-10]. The phenomenon is observed across different species (e.g., [11, 12]) and demonstrated in a variety of testing situations, including consummatory behavior [13] and instrumental appetitive [8] and aversive learning [14]. SNC has been explained in terms of perceptual processes, associative mechanisms [15-17], and more frequently, emotional behavior (anxiety, frustration, disappointment or psychological pain; [13, 18-20]). Pharmacological and neuroanatomical differences have been observed between consummatory and instrumental SNC procedures, suggesting that the hippocampus is involved in instrumental SNC (iSNC), whereas amygdala functioning underlies consummatory SNC (cSNC; [21-25]). In spite of these neurobiological studies, the molecular and genetic bases of reward loss-induced responses are still scarcely known [26].

The psychogenetic basis of frustration have been recently explored using strains of rats selected for their differences in responding to or coping with stressors: the inbred Roman High-(RHA-I) and Roman Low-Avoidance (RLA-I) rats, both derived from the outbred Swiss sublimes of Roman rats (RHA/Verh and RLA/Verh, respectively; [27, 28]. The original psychogenetic selection procedure (based on good vs. extremely poor acquisition of the two-way active avoidance response) has led to stable strain divergence related to anxiety/fearfulness and behavioral inhibition/activation traits (i.e., coping style; [29]). Consistent with these results, Roman rats showed significant differences in frustration paradigms such as iSCN and cSNC [30-32], extinction [33, 34], partial reinforcement extinction effect [35], and partial reinforcement contrast effect [36]. The next step was to apply the molecular technique of microarray (that allows for the analysis of thousands of genes in parallel) with the aim of analyzing whether differential gene-expression profiles in the brain could underlie the strain differences in behavior described above. With this goal in mind, two preliminary microarray and qRT-PCR studies were conducted under basal conditions. First, we showed that RHA-I and RLA-I rats differed in the whole brain expression of genes related to emotion, stress, aversive learning, drug seeking behavior, and neuropsychiatric disorders (EPHX2, PRL, CaMKII, CRHBP, and HOMER3; [37]). Second, strain differences were also obtained in the hippocampal expression of 33 genes related to central nervous system functions, such as neurotransmission, hormonal responses, behaviors, drug effects, perception and neural projection [38]. In the present experiment, we extended these studies by analyzing strain differences in hippocampal gene expression after an aversive and unexpected experience of reward-devaluation (iSNC). This effect was induced by exposing food-deprived RHA-I and RLA-I male rats to a reduction in the amount of solid food presented in the goal of a straight alley

(from 12 pellets in preshift trials to 2 pellets in postshift trials). We based our study on the following hypotheses and predictions. First, we selected the hippocampus because of evidence suggesting that this structure regulates frustration responses under instrumental conditions [13]. Actually, it is worth noting that RLA-I rats present significantly higher neuronal density in the hippocampus [39] than their RHA-I counterparts, a finding which is compatible with the enhanced sensitivity to reward-loss-induced “frustration” (and conflict-induced behavioral inhibition) seen in RLA-I rats. Second, given that consistent differences have been observed between RHA-I and RLA-I rats in frustration tasks [30], we predicted that the iSNC effect would appear only in the more anxious RLA-I strain. Third, we expected to find expression differences in genes functionally linked to hippocampal-dependent negative emotions (e.g., [40-42]), and in genes previously shown to be differentially expressed in Roman rats [37, 38, 43, 44]. Finally, the nomination of unsuspected genes as candidate genes underlying frustration-mediated processes can be facilitated by the use of this assumption-free approach of gene expression profiling.

2. METHOD

2.1 Subjects

Male 4-month-old RHA-I (n = 32) and RLA-I (n = 32) rats were used. Animals were housed in pairs with food and water continuously available and deprived to 85% of ad lib feeding weight via daily feedings of lab chow approximately 30 min after each experimental session. Room temperature was kept at about 22 °C. Animals were maintained under a 12-h light/12-h dark cycle with lights on at 08:00 h. The experiment was conducted following European Union (EU) guidelines for the use of animals in research (86/609/EEC).

2.2 Apparatus

Two wooden runways painted green, 120-cm long, 14-cm high, and 11-cm wide, were used for training. Each runway was divided into a start box (20-cm long), a central section (80-cm long), and a goal box (20-cm long). Guillotine doors operated manually separated these compartments. The food reward was 45-mg pellets (formula P; Research Diets, Inc., Noyes Precision Pellets, Lancaster, NH). Pellets were placed on the floor at the distal end of the goal box. Time to run through the runway was manually registered by using a manual stop watch (Extech, model 365510, Madrid, Spain). Trials began as soon as the start door was raised, and the chronometer was stopped when the rat entered the goal section with its four paws.

2.3 Behavioral Procedure

The procedure used was similar to that described in [30]. Rats were moved from the colony to an adjacent experimental room in their own home-cages and then carried to the experimental room in sets of eight. The 2 squads always involved the same animals. The floor of the apparatus was vacuumed and wiped with a 70% ethanol solution after every set of rats finished its session. The experiment was conducted in three phases: pretraining, preshift, and postshift phases.

2.4 Pretraining

Three habituation days to the apparatus preceded training. On the first day, rats were placed in the start box with both doors open and given five 1-min access periods to the entire runway spaced about 10 min apart. On the following day, rats were given two 1-min access periods, followed by three goal-box feedings (the animal was confined to the goal box and given the appropriate number of pellets (12 pellets vs. 2 pellets). For

half of the animals in each strain, RHA (n=16) and RLA (n=16), the preshift reward was 12 pellets (Groups H12-2 and L12-2). For the other half of rats in each strain, RHA (n=16) and RLA (n=16), the reward was set at 2 pellets in all sessions (Groups H2-2 and L2-2). The last habituation day consisted of three goal-box feedings spaced about 10 min apart. Subjects were given a maximum of 30 s to consume the food reward and were then removed from the goal box. Twelve Noyes pellets were placed in the home cage 30 min after the third habituation session along with their daily ration of lab chow.

2.5 Preshift Phase

Training began on the fourth day. Each animal was placed in the start box with the start box door closed and the goal box door opened. The start box door was then opened and the rat was allowed to run down the runway to obtain the food reward (either 12 or 2 pellets, as indicated above). A maximum time of 20 s was allowed for the rat to complete the trial. If the rat did not reach the goal box before 20 s had elapsed, it was gently pushed down the runway by the experimenter and 20 s was recorded for the time. When the rat reached the goal box, the goal box door was quietly closed by the experimenter and a stopwatch was started. The rat was given a maximum of 30 s to consume the food reward. As soon as the rat had finished eating or 30 s had elapsed, it was removed from the goal box and placed back in its home cage. The number of pellets left uneaten, if any, was noted. The rats were kept in the home-cage between trials. In this way, groups of up to eight rats at a time were run and trials were spaced about 10 min apart. Each rat received 6 trials per day within the first 4.5 h of the light/dark cycle. The preshift phase lasted 10 days.

2.6 Postshift Phase

From the 10th day of training onward all rats received 2 pellets upon arrival to the goal-box. The postshift phase lasted between 1 and 3 days depending on the latency criteria (see below).

2.7 Dependent Variable

The time spent running from the start section to the goal section of the straight alley was manually recorded and used as the dependent variable. To extract the hippocampus after the session in which the animals showed the greatest iSNC effect (i.e., an impairment of the running response as compared to the control groups), two latency criteria were used. An animal in a contrast group was sacrificed whenever (a) the mean latency of the postshift session was higher than twice the mean latency of the last preshift session, and (b) the mean latency of the postshift session was more than 2 standard deviations above the mean latency of the control, 2-2 group. Three RLA rats belonging to the contrast group and accomplishing these criteria (and their corresponding L2-2 yoked animals housed in the same home cage) were sacrificed 2.5 h after the first postshift session, five after the second session, and two after the third session. None of the H12-2 rats fulfilled these criteria, so each one was yoked to a specific L12-2 rat and sacrificed depending of the latency of its corresponding RLA rat. Each rat in the H2-2 group sharing the home cage with the selected H12-2 animal was also sacrificed. Therefore, all rats were behaviorally equated according to the performance of L12-2 rats.

2.8 Microarray analysis and q-RT-PCR validation

Rats (N= 4 at each condition) were sacrificed and the hippocampal region was isolated and immersed immediately in liquid nitrogen and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. RNA

isolation, microarray hybridization and raw data extraction was carried out by iGenomix (Valencia, Spain). Briefly, brain tissue was homogenized in a 10-fold volume (w/v) of ice-cold Trizol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Total RNA was precipitated by adding isopropanol and centrifuged at $15,000 \times g$ for 12 min. RNA quality was assessed in an A2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Samples were hybridized onto the Whole Rat Genome Codelink Bioarray (Amersham Biosciences) encompassing more than 55,000 rats DNA probes. The protocols for sample preparation and hybridization were adapted from the CodeLink Technical Manual. Total RNAs were prepared from a biological sample and a set of bacterial mRNAs of known concentrations (which are provided by the manufacturers and have complementary sequences to the positive control probes on the Bioarrays). One microgram of total RNA was reverse transcribed into cDNAs and amplified into cRNAs, using in vitro transcription. The cRNAs are labelled with avidin, and the fluorescent dye (Cy-5) was bound with streptavidin to the labeled cRNA. Then the labelled cRNAs were hybridized to a CodeLink Bioarray presynthesized. The hybridized microarrays were scanned in a Axon 4100A scanner (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and data extracted with GenePix Pro 6.0 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Total RNA (1 g) was reverse-transcribed using an Advantage RT-for-PCR kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Each sample was diluted to a final volume of 12.5 ml in diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water, and 1 ml oligo (18-dT) was added, heated at 70 °C for 2 min, and kept on ice until 6.5 ml mastermix—4 ml 5_′ reaction buffer, 1 ml dNTP mix of 10 mmol each, 0.5 ml recombinant RNase Inhibitor, 1 ul MMLV (Moloney-Murine Leukaemia Virus) reverse transcriptase was added. The reaction was incubated at 42 °C for 1 h, and heated at 94

°C for 5 min to stop cDNA synthesis and destroy DNase activity. The products were diluted to a final volume of 100 µl in DEPC-treated water.

Real-time PCR was performed using a LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions on a Roche LightCycler platform (Roche, Göttingen, Germany). We employed 200 ng of cDNA for each analyzed sample. A calibration curve was included in each experiment (five serial dilutions). The final products were analyzed by using the provided software (Roche Molecular Biochemicals LightCycler Software v3.5). Data are presented as the ratio between the expression of the gene vs. the expression of the human GAPDH gene. Melting curves were analyzed to confirm amplification specificity. The genes PSORS1, THAP1, NANOS1, RGSL2H, PKD2L1, TAAR2 and SLC45A3 were used for microarray validation. Forward and reverse primer pair sequences for each gene were (5'–3'): PSORS1, Fw- TGGTGCCTGGCCCCCTAAGC, Rv- TTCCCGGGGTGGGTCAAGGTC; THAP1, Fw- AAAGCCACCGAAAGCGGCGA, Rv- GCAGCCGTAGGCGGAACAGG; NANOS1, Fw- ACAACAAGGAGGCGGTGGCG, Rv- CACAGGGGGCACGTGTAGCG; RGSL2H, Fw- GGAGCAAGGCGCCCAAGCAT, Rv- CCCACGAGGGTCAGCAGGA; PKD2L1, Fw- GAGCTGGCTGGCCAGAGGGA, Rv- TCTCTGGCTCCCCGCCCTTC; TAAR2, Fw- GTCAGTCCCCGGGGCGTTTG, Rv- AGGTGGTCCCCCAGAGCTTGT; SLC45A3, Fw- CTCCCCGGTTCTCAGCCCCA, Rv- CCCAAGTGGGAAGCCGCCAG

2.9 Statistical Analyses

2.9.1 Behavior

The mean latency corresponding to the last preshift session and the postshift session in which the animal accomplished the latency criteria were subjected to a 3-factor analysis of variance, with Strain (RLA vs. RHA), Reinforcement (12 pellets vs. 2 pellets), and Latency (preshift, postshift) as factors. The analysis also included the latency values of the corresponding L2-2, H12-2, and H2-2 yoked animals. For all statistical analyses, alpha was set at 0.05.

2.9.2 Microarray

Statistical analysis was carried out using the R software (<http://www.r-project.org/>) and the appropriate Bioconductor packages (<http://www.bioconductor.org/>) run under R (see below). In order to remove all the possible sources of variation of a nonbiological origin between arrays, densitometry values between arrays were normalized using the quantiles normalization function implemented in the Bioconductor *limma* package. Statistically significant differences between groups were identified using the rank product nonparametric test implemented in the Bioconductor *RankProd* package. Applying a Student t test with such a limited amount of samples (3 in each experimental group) is problematic because the obtained statistical significance is not robust; in this situation the mean and the standard deviation could be easily biased by outliers; thus we have carried out a nonparametric statistical test as a rough filter to narrow down the list of most relevant genes. Moreover, the rank product approach includes a multiple hypothesis test for raw p-value correction (here named pfp correction; cut-off <0.05) to ascertain a false-positive rate similar to false discovery rate (FDR) correction.

Functional annotations were carried out using the Ingenuity Pathways Analysis platform (<http://www.ingenuity.com/>]; 22/07/11),

3. RESULTS

3.1 Behavior

A mixed-model ANOVA (Strain x Reinforcement x Latency) showed significant main effects of Strain, $F(1, 36)=64.65$, $p<0.0001$; Reinforcement, $F(1, 36)=16.81$, $p<0.0001$; and Latency $F(1,36)=15.31$, $p<0.0001$. Moreover, significant Strain x Reinforcement, $F(1,36)=15.31$, $p<0.0001$; Strain x Latency, $F(1,36)=49.39$, $p<0.0001$; Reinforcement x Latency, $F(1, 36)=49.39$, $p<0.0001$; and Strain x Reinforcement x Latency interactions, $F(1,36)=39.582$, $p<0,000$, were found (see Figure 1). To explore the source of this triple interaction, we first analyzed the Reinforcement x Session interaction in each strain. In the RLA strain, main effects of Reinforcement, $F(1,18)=16.98$, $p<0.001$; Latency, $F(1, 18)=28.39$, $p<0.0001$; and the Reinforcement x Latency interaction, $F(1, 18)=45.406$, $p<0.0001$, were obtained. The interaction analysis revealed marginal differences between groups L12-2 and L2-2 in the preshift phase, $F(1, 18)=4.38$, $p<0.051$. In the postshift phase, significant differences between the groups 12-2 and 2-2 were obtained, $F(1,18)=34.098$, $p<0.0001$ (see Figure 3). In RHA-I rats, a significant Reinforcement x Latency interaction was found, $F(1,18)=5.832$, $p<0.027$. However, no differences were obtained between Groups H12-2 and H2-2 in the preshift phase, $F(1,18)=0.78$, $p<0.39$, either the postshift phase, $F(1, 18)=1.975$, $p<0.17$ (see Figure 3). Finally, the Strain x Latency interaction was analyzed on each reinforcement condition (12-2 vs. 2-2). In the 12-2 condition, repeated-measure ANOVA (Strain x Latency) showed a significant main effect of Strain, $F(1,18)=42.91$, $p<0.0001$; Latency, $F(1,18)=59.71$, $p<0.0001$; and a significant Strain x Latency interaction, $F(1,18)=48.28$, $p<0.0001$. The analysis of the interaction revealed significant strain differences in the preshift, $F(1,18)=15.38$, $p<0.001$; and the postshift phases, $F(1,18)=46.02$, $p<0.0001$.

For Groups H2-2 and L2-2, only an effect of the variable Strain, $F(1,18)=25.439$, $p<0.0001$, was obtained. Therefore, the present results indicated that regardless the reinforcement condition, RLA-I rats showed higher running latencies compared to RHA-I rats, and, most importantly, the iSNC effect appeared only in the more emotional RLA-I strain, as opposed to the less emotional RHA-I strain (Figure 1).

3.2 Gene expression analysis

Table I presents the results of the cDNA microarray hybridizations. Two hybridized microarrays for the detection of differential gene expression were conducted, comparing the hippocampal genetic expression in Group L12-2 vs. L2-2, and in Group L12-2 vs. H12-2, respectively ($p < 0.05$). Eighteen genes were found to be differentially expressed between the two comparisons. Three genes were detected as up-regulated and five were down-regulated in Group L12-2 when compared to Group L2-2. On the other hand, ten genes were up-regulated in Group L12-2 in comparison to Group H12-2. Seven of these genes were selected as candidates for RT-PCR validation. Two of them were those with highest (PSORS1, SLC45A3) and lowest (NANOS1) fold-change values, and the other four (THAP1, RGSL2H, PKD2L1 and TAAR2) were selected according to their behavior/brain-related functions (see Table I). The gene expression tendency was validated for the selected genes, with the exception of RGSL2H and SLC45A3. Gene enrichment analysis of the (validated) differentially expressed genes showed their implication in relevant biological functions such as cellular growth and proliferation, neurological diseases and behavior (Figure 2).

4. DISCUSSION

In this study, strains of rats genetically selected on the basis of fearfulness/emotionality were exposed to an iSCN situation with several goals in mind. First, we explored whether strain differences in behavior could be obtained by suddenly reducing the reward magnitude from 12 pellets in the preshift phase to 2 pellets in the postshift phase, as previous studies suggest [30]. Second, we compared large-scale gene expression profiles in the hippocampus of RHA-I and RLA-I rats, to further investigate putative genetic mechanisms correlated to the strain differences observed in this anxiogenic/frustrating task. The iSNC effect only appeared in the more emotional RLA-I rats (higher response latencies in the Group 12-2 compared to Group 2-2 in the postshift phase), supporting theories that account for this effect on the basis of emotional mechanisms [13, 19, 20]. Behavioral differences between strains and groups were accompanied by hippocampal divergence in the expression of eighteen genes. Six genes were validated through RT-PCR, four of them being linked to behavioral/neurobiological traits shown to be divergent between in Roman rats.

Although the RGSL2H gene (encoding regulator of G-protein signaling 2) was not validated through qRT-PCR, it is worth noting that this gene has been proposed as a quantitative trait gene for anxiety behavior in mice [45], and it has also been associated with intermediate phenotypes and human anxiety disorders [46]. Any conclusion about the implication of this gene in the strain differences observed in iSNC will have to wait for confirmation/validation of the present results.

The trace amine receptor 2 (TAAR2) gene (also known as GPR58 and corresponding to G-protein coupled receptor 58) was up-regulated in L12-2 rats as compared to H12-2 rats. The trace amines constitute a family of endogenous compounds with strong structural similarity to classical monoamine neurotransmitters [47, 48], having been proposed as possible modulators of these neurotransmitters within

defined physiological limits [49]. Consistent to this view, trace amines receptors are widely distributed in brain monoaminergic systems and co-localized with the dopamine transporter in a subset of dopaminergic neurons in the substantia nigra of rhesus monkeys and mice [50]. Phenylethylamine (PEA) has been suggested as an endogenous ligand for trace amines receptors [51, 52]. PEA alters the monoamine transporter function in synaptosomes of the brain of mice and rhesus monkeys, suggesting a modulatory role for this receptor in the presynaptic regulation of monoaminergic activity [50].

Several lines of evidence indicate that aberrant levels of these amines are associated with various neuropsychiatric disorders/diseases, including schizophrenia, attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), drug abuse/dependence, depression and stress/anxiety disorders (see [49]). Thus, PEA has been found to be elevated in the urine and blood of schizophrenics [53]. Moreover, one polymorphism in TAAR2 gene has been suggested to be associated with schizophrenia [51]. Overall, these results are consistent with an over-activity of trace amine systems being involved in the pathogenesis of schizophrenia [49].

PEA has been also identified as a possible factor for the onset of ADHD [54]. PEA has been shown to induce hyperactivity and aggression in experimental animals, two of the cardinal clinical features of ADHD, [55]. In addition, urinal PEA levels have been reported to be decreased in ADHD patients compared to both control subjects and patients with autism [56, 57]. Evidence for a decrease in PEA levels in the brain of ADHD patients have also been reported [58]. Taken together, these studies point to a link between trace aminergic functioning and some clinical symptoms of the ADHD disorder.

Trace amines have also been linked to neural mechanisms underlying drug abuse and dependence. Within this context, PEA has been proposed to act as an endogenous amphetamine, being involved in brain mechanisms underlying reward and reinforcement [52]. According to this view: (1) behavioral responses to PEA resemble those seen with amphetamine; (2) experimental animals self-administer PEA; and (3) chronic administration of PEA induces behavioral sensitization [59-61].

Trace amines have also received much attention with respect to the etiology of affective disorders, suggesting that they maintain mental functions within “normal” limits [62]. Once again, most of this attention has focused on a role for PEA. Deficits in PEA functioning/turnover are associated with depression, whereas elevated PEA functioning is associated with mania [54, 55, 62, 63]. Reserpine, a drug that can precipitate episodes of depression [65], decreases central trace amine levels [64]. The antidepressant effects of exercise have also been related to an exercise-induced elevation of PEA [66].

Finally, PEA has been proposed to be anxiogenic in experimental animals, at lower doses than those usually required to elicit amphetamine-like responses [67]. These anxiogenic effects are prevented by the anxiolytic agent diazepam [67]. Paulos and Tessel [68] investigated the excretion of PEA following a stressful experience (parachuting). They found that the urinary excretion of PEA was markedly increased after the parachuting experience. These changes were not correlated with changes in urinary pH or creatinine excretion, suggesting that the results do not merely represent a global change in metabolism [67]. Such an anxiogenic effect of PEA could be compatible with the present finding of an up-regulation of TAAR2 gene expression in L12-2 vs H12-2 rats.

As can be seen, there is a large body of evidence linking alterations in trace amines and their metabolism to a variety of clinical conditions related to monoaminergic neurotransmission. Consistent with these results, several studies suggest that the behavioral patterns that distinguish the Roman rat lines/strains may be mediated, at least in part, by differences in the functional properties of their dopaminergic and serotonergic systems, including behavioral differences in emotionality, coping style, reactivity to stress, impulsivity, novelty seeking, and drug sensibility [69-75]. According to this view, the RHA line/strain shows a neurobehavioral profile with cognitive and attentional anomalies characteristic of schizophrenic and/or impulsive spectrum. In this connection, Fernández-Teruel et al. [76] found a latent inhibition deficit in RHA-I with respect to Sprague-Dawley rats, while our most recent results also demonstrate a profound deficit in prepulse inhibition in RHA-I Vs RLA-I rats (Fernández-Teruel et al. in preparation). Additional associative learning deficits related to the schizophrenic spectrum have been described in the RHA rat line/strain as compared to RLA rats, including classical fear (freezing) conditioning, fear-potentiated startle response, conditioned taste aversion, and working memory, among others [77-81]. As indicated above, differences in dopaminergic neurotransmission could underlie these strain behavioral divergences, including higher levels of dopamine registered in the nucleus accumbens in response to the acute and chronic administration of psychostimulants, morphine, and ethanol; higher density of D1 dopamine receptors in the nucleus accumbens; higher stereotypic responses induced by the injection of high doses of apomorphine; and higher levels of dopaminergic prefrontal activity induced by a variety of stressors (observed in RHA-I rats compared to RLA-I rats; [69, 72, 82, 83]). Given that the trace amine system has been involved in the modulation of monoaminergic systems and neuropsychiatric conditions known to be

divergent in Roman rats, the present results suggest that differences in the expression of TAAR2 could partially underlie the behavioral and neurochemical differences observed in these strains.

THAP1 (domain containing, apoptosis-associated protein 1) gene was up-regulated in L12-2 rats compared to L2-2 rats. THAP mutations are a common cause of both early- and late-onset primary dystonia, a movement disorder expressed as involuntary excessive and sustained muscle activity [84]. It has been suggested that dystonia may involve abnormalities in synaptic plasticity in the striatum through dopamine and acetylcholine neuromodulatory systems (see [84] for review). Although speculative, these results could be relevant for the understanding of the strain locomotor differences observed in a variety of experimental situations [85]. In addition, in vitro studies suggest that THAP1 binds to the promoter region of TOR1A and regulates its expression. This gene is also associated to primary dystonia [86, 87]. Interestingly, knock-in mice (KI) in TOR1A gene exhibited an enhancement in the formation of cued fear memories. Anatomical analysis also indicated that the number of c-fos positive cells was significantly increased while the size of the central nucleus of the amygdala was significantly reduced in these KI mice [88]. Given that the amygdala and the hippocampus are essential for the expression of a variety of fear/anxiety-dependent associative learning tasks (including incentive loss associated phenomena) the iSNC effect observed in RLA-I rats as opposed to RHA-I rats could depend of an increased sensitivity of the THAP1 gene to reward devaluation in the former strain compared to the latter.

The polycystic kidney disease-like ion channel PKD2L1 was up-regulated in L12-2 rats in comparison to H12-2 rats. This gene partially contributes to sour taste responses in mice at the level of fungiform papillae (FP) taste cells and whole chorda

tympani (CT) nerves. The sour taste serves to detect acid in foods and drinks, and deter animals from ingesting spoiled and unripe food sources, a function of significant importance in evolutionary terms [89]. Although the implication of strain differences in sour taste sensitivity seems to be remote in the present study, some results obtained in a variety of consummatory tests (including sucrose, saccharine, and quinine solutions) could be partially explained on the basis of strain differences in palatability [32, 43, 90].

Finally, NANOS1 gene was down-regulated in L12-2 rats relative to L2-2 animals. This gene encodes an RNA-binding, which contains a putative zinc-finger motif that exhibits similarity with other *nanos*-class genes in vertebrates and invertebrates. NANOS1 gene has been involved in the formation of germ cells as well as in the development of the nervous system. Although NANOS1 is not detected in primordial germ cells, it is observed in seminiferous tubules of mature testis. Interestingly, maternally expressed NANOS1 is observed in substantial amounts in oocytes, but the amount of maternal RNA is rapidly reduced after fertilization, and the transient zygotic NANOS 1 expression is observed in eight-cell embryos. At 12.5 days postcoitum, NANOS 1 is re-expressed in the central nervous system and the expression continues in the adult brain, in which the hippocampal formation is the predominant region [91]. Given the relevance of the hippocampus in modulating frustration phenomena dependent on instrumental responses [13, 19], further studies will enable us to analyze the specific role of the NANO1 gene in the differential susceptibility of Roman rats to incentive loss experiences.

In summary, the present findings suggest that RHA-I/RLA-I differences observed in iSNC are accompanied by divergence in hippocampal gene expression of molecules related to schizophrenia, drug abuse, affective disorders, anxiety, fear memory, taste sensitivity, and hippocampus development. None of the genes found

have been associated before with anxiety or frustration states (except the *Rgs12* gene, which was not validated in the present study), but direct comparison with previous works is precluded by the fact that, firstly, some of the studies evaluated the association of gene expression with an anxiety-related trait (rather than a state; e.g. [37, 38, 43]) or, secondly, an anxiety state was induced through procedures different from the one used in the present work and in different rat strains (e.g. [1]). Some of the differentially-expressed genes found here could underlie the differences in reward-loss reactivity observed in Roman rats, which would further support the utility of microarray for analyzing differential gene expression as a function of divergent profiles in a given behavioral/psychological trait [92].

Comparative studies in these rat strains may help to shed light on the relationships between genotype, temperament traits, and neural mechanisms underlying the vulnerability or resistance to reward-loss experience in humans.

5. REFERENCES

- [1] Wang H, Zhu Y, Wong P, Farook J, Teo A, Lee L, et al. cDNA microarray analysis of gene expression in anxious PVG and SD rats after cat-freezing test. *Exp Brain Res* 2003; 149: 413-421.
- [2] Scully JA, Tosi H, Banning K. Life event checklists: Revisiting the social Readjustment Rating Scale after 30 years. *Educ Psychol Meas* 2000; 60: 864-876.
- [3] Leslie JC, Shaw D, McCabe C, Reynolds DS, Dawson GR. Effects of drugs that potentiate GABA on extinction of positively-reinforced operant behaviour. *Neurosci Biobehav R* 2004; 28: 229-238.
- [4] Pellegrini S, Muzio RN, Mustaca AE, Papini MR. Successive negative contrast after partial reinforcement in the consummatory behavior of rats. *Learn Motiv* 2004; 35: 303-321.
- [5] Flaherty C. F. (1991). Incentive contrast and selected animal models of anxiety. *Current Topics in Animal Learning: Brain, Emotion, and Cognition*, 207-243.
- [6] Pellegrini S, Mustaca A. Consummatory successive negative contrast with solid food. *Learn Motiv* 2000; 3: 200-209.
- [7] Mitchell CP, Flaherty CF. Differential effects of removing the glucose or saccharin components of a glucose–saccharin mixture in a successive negative contrast paradigm. *Physiol Behav* 2005; 84: 579-583.
- [8] Crespi LP. Quantitative variation of incentive and performance in the white rat. *Am J Psychol* 1942; 55: 467-517.
- [9] Cross HA, Boyer WN. Evidence of a primary frustration effect following quality reduction in the double runway. *J Exp Psychol Anim B* 1974; 102: 1069-1075.
- [10] Elliott MH. The effect of change of reward on the maze performance of rats. *A Preliminary Study in Discrimination of Maze Patterns by the Rat*. 4(1-21): 19. 1928

- [11] Mustaca AE, Bentosela M, Papini MR. Consummatory successive negative contrast in mice. *Learn Motiv* 2000; 31: 272-282.
- [12] Papini MR. Comparative psychology of surprising nonreward. *Brain Behav Evolut* 2003; 62: 83-95.
- [13] Flaherty CF. Incentive relativity. New York: Cambridge University press; 1996
- [14] Cándido A, Maldonado A, Megías JL, Catena A. Successive negative contrast in one-way avoidance learning in rats. *Q J Exp Psychol-B* 1992; 45: 15-32.
- [15] Black RW. Shifts in magnitude of reward and contrast effects in instrumental and selective learning: A reinterpretation. *Psychol Rev* 1968; 75: 114.
- [16] Capaldi E. The sequential view: From rapidly fading stimulus traces to the organization of memory and the abstract concept of number. *Psychon B Rev* 1994; 1: 156-181.
- [17] Capaldi EJ, Lynch D. Repeated shifts in reward magnitude: evidence in favor of an associational and absolute (noncontextual) interpretation. *J Exp Psychol Anim B* 1967; 75: 226-235.
- [18] Amsel A. The role of frustrative nonreward in noncontinuous reward situations. *Psychol Bull* 1958; 55: 102-119.
- [19] Gray JA. The psychology of fear and stress. Cambridge: University Press. Cambridge and New York; 1987
- [20] Papini MR. (2006). Role of surprising nonreward in associative learning. *JPN J Anim Journal Psychol* 2006; 56: 35-54.
- [21] Ruetti E, Justel N. Bases Neurobiológicas de la Frustración. *RACC* 2010; 2: 45-60.
- [22] Flaherty CF, Coppotelli C, Hsu D, Otto T. Excitotoxic lesions of the hippocampus disrupt runway but not consummatory contrast. *Behav Brain Res* 1998a; 93: 1-9.

- [23] Leszczuk MH, Flaherty CF. Lesions of nucleus accumbens reduce instrumental but not consummatory negative contrast in rats. *Behav Brain Res* 2000; 116: 61-79.
- [24] Liao RM, Chuang FJ. Differential effects of diazepam infused into the amygdala and hippocampus on negative contrast. *Pharmacol Biochem Be* 2003; 74: 953-960.
- [25] Sastre A, Reilly S. Excitotoxic lesions of the gustatory thalamus eliminate consummatory but not instrumental successive negative contrast in rats. *Behav Brain Res* 2006; 170: 34-40.
- [26] Pecoraro N, Dallman MF. c-fos after incentive shifts: Expectancy, incredulity, and recovery. *Behav Neurosci* 2005; 119; 366-387.
- [27] Driscoll P, Bättig K. Behavioral, emotional and neurochemical profiles of rats selected for extreme differences in active, two-way avoidance performance. Amsterdam: Elsevier; 1982
- [28] Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Gil L, Aguilar R, Tobeña A, Driscoll P. Inbred Roman High- and Low- Avoidance rats: differences in anxiety, novelty-seeking and shuttlebox behaviours. *Physiol Behav* 1999; 67: 19-26.
- [29] Driscoll P, Fernández-Teruel A, Corda MG, Giorgi O, Steimer T. Some guidelines for defining personality differences in rats. In Yong-Kyu, K, editors. *Handbook of behavior genetics*. New York: Springer; 2009
- [30] Rosas JM, Callejas-Aguilera JE, Escarabajal MD, Gómez MJ, de la Torre L, Agüero A, et al. Successive negative contrast effect in instrumental runway behaviour: A study with roman high- (RHA) and roman low- (RLA) avoidance rats. *Behav Brain Res* 2007; 185: 1-8.
- [31] Torres C, Cándido A, Escarabajal MD, de la Torre L, Maldonado A, Tobeña A, et al. Successive negative contrast in one-way avoidance learning in female roman rats. *Physiol Behav* 2005; 85: 377-382.

- [32] Gómez MJ, Escarabajal MD, de la Torre L, Tobeña A, Fernández-Teruel A, Torres C. Consummatory successive negative and anticipatory contrast effects in inbred roman rats. *Physiol Behav* 2009; 97: 374-380.
- [33] Gómez MJ, de la Torre L, Callejas-Aguilera JE, Rosas JM, Escarabajal MD, Agüero Á, et al. Differences in extinction of an appetitive instrumental response in female inbred roman high- (RHA-I) and low- (RLA-I) avoidance rats. *Psicológica* 2009; 30: 181-188.
- [34] Coppens CM, de Boer SF, Steimer T, Koolhaas JM. Correlated Behavioral Traits in Rats of the Roman Selection Lines. *Behav Genet* 2013; 1-7.
- [35] Gómez MJ, de la Torre L, Callejas-Aguilera JE, Lerma-Cabrera JM, Rosas JM, Escarabajal MD et al. The partial reinforcement extinction effect (PREE) in female Roman high- (RHA-I) and low-avoidance (RLA-I) rats. *Behav Brain Res* 2008; 194: 187-192.
- [36] Cuenya L, Sabariego M, Donaire R, Fernández-Teruel A, Tobeña A, Gómez MJ et al. The effect of partial reinforcement on instrumental successive negative contrast in inbred roman high- (RHA-I) and low- (RLA-I) avoidance rats. *Physiol Behav* 2012; 105: 1112-1116.
- [37] Sabariego M, Gómez MJ, Morón I, Torres C, Fernández-Teruel A, Tobeña A, et al. Differential gene expression between inbred roman high- (RHA-I) and low- (RLA-I) avoidance rats. *Neurosci Lett* 2011; 504: 265-270.
- [38] Blázquez-Romero G, Díaz-Morán S, Palència M, Mont-Cardona C, Cañete T et al. Hippocampal gene expression profile in inbred Roman high- (RHA-I) and Low- (RLA-I) Avoidance rats. Poster presented at the FENS Forum of Neuroscience VIII (Barcelona, Spain); 2012

- [39] García-Falgueras A, Castillo-Ruiz MM, Put T, Tobeña A, Fernández-Teruel A. Differential hippocampal neuron density between inbred Roman high- (low anxious) and low-avoidance (high anxious) rats. *Neurosci Lett* 2012; 26, 522:41-6.
- [40] Hou YY, Liu Y, Kang S, Yu C, Chi ZQ, Liu JG. Glutamate receptors in the dorsal hippocampus mediate the acquisition, but not the expression, of conditioned place aversion induced by acute morphine withdrawal in rats. *Acta Pharm Sinic* 2009; 30: 1385-91.
- [41] Mei B, Chuxia L, Dong S, Jiang CH, Wang H, Hu Y. Distinct gene expression profiles in hippocampus and amygdala after fear conditioning. *Brain Res Bull* 2005; 67: 1-12.
- [42] Wang J, Wang YH, Hou YY, Liu Y, Liu YG. The small GTPase RhoA, but not Rac1, is essential for conditioned aversive memory formation through regulation of actin rearrangements in rat dorsal hippocampus. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34:811-8.
- [43] Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Gray JA, Aguilar R, Gil L, Giménez-Llort L, et al. A quantitative trait locus influencing anxiety in the laboratory rat. *Genome Res* 2002; 12: 618-626.
- [44] Zhang S, Amstein T, Shen J, Brush FR, Gershenfeld HK. Molecular correlates of emotional learning using genetically selected rat lines. *Genes Brain Behav* 2005; 4: 99-109.
- [45] Yalcin B, Willis-Owen SAG, Fullerton J, Meesaq A, Deacon RM, Rawlins JNP, et al. Genetic dissection of a behavioral quantitative trait locus shows that *Rgs2* modulates anxiety in mice. *Nat genet* 2004; 36: 1197-1202.

- [46] Smoller JW, Paulus MP, Fagerness JA, Purcell S, Yamaki LH, Hirshfeld-Becker D, et al. Influence of RGS2 on anxiety-related temperament, personality, and brain function. *Arch Gen Psychiat*. 2008; 65: 298-308.
- [47] Borowsky B, Adham N, Jones KA, Raddatz R, Artymyshyn R, Ogozalek KL, et al. Trace amines: Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *PNAS* 2001; 98: 8966-8971.
- [48] Bunzow JR, Sonders MS, Arttamangkul S, Harrison LM, Zhang G, Quigley DI, et al. Amphetamine, 3, 4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 1181-1188.
- [49] Berry M. The potential of trace amines and their receptors for treating neurological and psychiatric diseases. *Rev Rec Clin Trials* 2007; 2: 3-19.
- [50] Xie Z, Miller GM. Trace amine-associated receptor 1 as a monoaminergic modulator in brain. *Biochem Pharmacol* 2009; 78: 1095-1104.
- [51] Bly M. Examination of the trace amine-associated receptor 2 (TAAR2). *Schizophr Res* 2005; 80: 367-368.
- [52] Janssen PA, Leysen JE, Megens AA, Awouters FH. Does phenylethylamine act as an endogenous amphetamine in some patients? *Int J Neuropsychop* 1999; 2: 229-240.
- [53] O'reilly RL, Davis BA. Phenylethylamine and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 1994; 18: 63-75.
- [54] Lindemann L, Hoener MC. A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 274-281.

- [55] Sabelli H, Mosnaim A, Vázquez, A. Phenylethylamine: Possible role in depression and antidepressive drug action. Neurohumoral coding of brain function (pp. 331-357) Springer; 1974.
- [56] Baker GB, Bornstein R, Rouget A, Ashton S, Van Muyden J, Coutts R. Phenylethylaminergic mechanisms in attention-deficit disorder. *Biol Psychiat* 1991; 29: 15-22.
- [57] Kusaga A, Yamashita Y, Koeda T, Hiratani M, Kaneko M, Yamada S, Matsuishi T. Increased urine phenylethylamine after methylphenidate treatment in children with ADHD. *Ann of Neurol* 2002; 52: 372-374.
- [58] Lewin AH. Receptors of mammalian trace amines. *The AAPS Journal* 2006; 8: E138-E145.
- [59] Borison RL, Sabelli HC, Maple PJ, Havdala HS, Diamond BI. Lithium prevention of amphetamine-induced 'manic' excitement and of reserpine-induced 'depression' in mice: Possible role of 2-phenylethylamine. *Psychopharmacology* 1978; 59: 259-262.
- [60] Greenshaw A. β -Phenylethylamine and reinforcement. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1984; 8: 615-620.
- [61] Shannon HE, Thompson WA. Behavior maintained under fixed-interval and second-order schedules by intravenous injections of endogenous noncatecholic phenylethylamines in dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 228: 691-695
- [62] Reynolds GP. Phenylethylamine — a role in mental illness? *Trends in Neurosciences* 1979; 2: 265-268.
- [63] Branchek TA, Blackburn TP. (2003). Trace amine receptors as targets for novel therapeutics: Legend, myth and fact. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3: 90-97.

- [64] Baumeister AA, Hawkins MF, Uzelac SM. The myth of reserpine-induced depression: Role in the historical development of the monoamine hypothesis. *J Hist Neurosci* 2003; 12: 207-220.
- [65] Boulton A, Juorio A, Philips S, Wu P. The effects of reserpine and 6-hydroxydopamine on the concentrations of some arylalkylamines in rat brain. *Brit J Pharmacol* 1977; 59: 209-214.
- [66] Szabo A, Billett E, Turner J. Phenylethylamine, a possible link to the antidepressant effects of exercise? *Brit J Sport Med* 2001; 35: 342-343.
- [67] Lapin IP. Beta-phenylethylamine (PEA): An endogenous anxiogen? Three series of experimental data. *Biol Psychiat* 1990; 28: 997-1003.
- [68] Paulos MA, Tessel RE. Excretion of beta-phenethylamine is elevated in humans after profound stress. *Science* 1982; 215: 1127-1129.
- [69] D'Angio M, Serrano A, Driscoll P, Scatton B. Stressful environmental stimuli increase extracellular DOPAC levels in the prefrontal cortex of hypoemotional (roman high-avoidance) but not hyperemotional (roman low-avoidance) rats. An in vivo voltammetric study. *Brain Res* 1988; 45: 237-247.
- [70] Giménez-Llort L, Cañete T, Guitart-Masip M, Fernández-Teruel A, Tobeña A. Two distinctive apomorphine-induced phenotypes in the Roman high- and low-avoidance rats. *Physiol Behav* 2005; 86: 458-66.
- [71] Giorgi O, Orlandi M, Escorihuela R, Driscoll P, Lecca D, Corda M. GABAergic and dopaminergic transmission in the brain of roman high-avoidance and roman low-avoidance rats. *Brain Res* 1994; 638: 133-138.
- [72] Giorgi O, Lecca D, Piras G, Driscoll P, Corda M. Dissociation between mesocortical dopamine release and fear-related behaviours in two

psychogenetically selected lines of rats that differ in coping strategies to aversive conditions. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 2716-2726.

- [73] Guitart-Masip M, Johansson B, Fernández-Teruel A, Cañete T, Tobeña A, Terenius L, Giménez-Llort L. Divergent anatomical pattern of D1 and D3 binding and dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa mRNA expression in the Roman rat strains: Implications for drug addiction. *Neuroscience* 2006; 142: 1231-43.
- [74] Guitart-Masip M, Johansson B, Fernández-Teruel A, Tobeña A, Giménez-Llort L. Divergent effect of the selective D3 receptor agonist pd-128,907 on locomotor activity in Roman high- and low-avoidance rats: relationship to NGFI-A gene expression in the Calleja islands. *Psychopharmacology (Berl)* 2008; 196: 39-49.
- [75] Piras G, Giorgi, O, Corda MG. Effects of antidepressants on the performance in the forced swim test of two psychogenetically selected lines of rats that differ in coping strategies to aversive conditions. *Psychopharmacology (Berl)* 2010; 211: 403-414.
- [76] Fernández-Teruel A, Blázquez G, Pérez M, Aguilar R, Cañete T, Guitart M et al. Latent inhibition threshold in roman high-avoidance rats: A psychogenetic model of abnormalities in attentional filter? *Actas Esp Psiquiatri* 2006; 34: 257-263.
- [77] Aguilar R, Escorihuela RM, Gil L, Tobeña A, Fernández-Teruel A. Differences between two psychogenetically selected lines of rats in a swimming pool matching-to-place task: long-term effects of infantile stimulation. *Behav Genet* 2002; 32: 127-134.
- [78] Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Castellano B, González B, Tobeña A. Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, Novelty/Reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: Focus on the roman rat lines. *Behav Genet* 1997; 27: 513-526.

- [79] López-Aumatell R, Blázquez G, Gil L, Aguilar R, Cañete T, Giménez-Llort L, et al. The Roman High- and Low-Avoidance rat strains differ in fear-potentiated startle and classical aversive conditioning. *Psicothema* 2009; 21: 27-32.
- [80] López-Aumatell R, Vicens-Costa E, Guitart-Masip M, Martínez-Membrives E, Valdar W, Johannesson M, et al. Unlearned anxiety predicts learned fear: a comparison among heterogeneous rats and the Roman rat strains. *Behav Brain Res.* 24 2009; 202: 92-101.
- [81] JR Martin, K Bättig. Acquisition and extinction of gustatory aversion in two lines of rats selectively bred for differential shuttlebox avoidance performance. *Behav Process* 1980; 5: 303–310.
- [82] Corda MG, Piras G, Lecca D, Fernández-Teruel A, Driscoll P, Giorgi O. The psychogenetically selected Roman rat lines differ in the susceptibility to develop amphetamine sensitization. *Behav Brain Res* 2005; 157: 147-156.
- [83] Lecca D, Piras G, Driscoll P, Giorgi O, Corda MG. A differential activation of dopamine output in the shell and core of the nucleus accumbens is associated with the motor responses to addictive drugs: A brain dialysis study in roman high- and low-avoidance rats. *Neuropharmacology* 2004; 46: 688-699.
- [84] Peterson DA, Sejnowski TJ, Poizner H. Convergent evidence for abnormal striatal synaptic plasticity in dystonia. *Neurobiol Dis* 2010; 37: 558-573.
- [85] Moreno M, Cardona D, Gómez MJ, Sánchez-Santed F, Tobeña A, Fernández-Teruel A, et al. Impulsivity characterization in the roman high- and low-avoidance rat strains: Behavioral and neurochemical differences. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35: 1198-1208.

- [86] Gavarini S, Cayrol C, Fuchs T, Lyons N, Ehrlich ME, Girard J, Ozelius LJ. Direct interaction between causative genes of DYT1 and DYT6 primary dystonia. *Ann Neurol* 2010; 68: 549-553.
- [87] Kaiser FJ, Osmanoric A, Rakovic A, Erogullari A, Uflacker N, Braunholz D, et al. The dystonia gene DYT1 is repressed by the transcription factor THAP1 (DYT6). *Ann Neurol* 2010; 68: 554-559.
- [88] Yokoi F, Dang MT, Miller CA, Marshall AG, Campbell SL, Sweatt JD, Li Y. Increased c-fos expression in the central nucleus of the amygdala and enhancement of cued fear memory in Dyt1 Δ GAG knock-in mice. *Neurosci Res* 2009; 65: 228-235.
- [89] Horio N, Yoshida R, Yasumatsu K, Yanagawa Y, Ishimaru Y, Matsunami H. PKD2L1 is associated with the sour taste transduction. *Neurosci Res* 2010; 68: e385.
- [90] Razafimanalina R, Mormede P, Velly L. Gustatory preference-aversion profiles for saccharin, quinine and alcohol in roman high-and low-avoidance lines. *Behav Pharmacol* 1996; 7: 78-84.
- [91] Haraguchi S, Tsuda M, Kitajima S, Sasaoka Y, Nomura-Kitabayashid A, Kurokawa K, et al. nanos1: A mouse nanos gene expressed in the central nervous system is dispensable for normal development. *Mech Dev* 2003; 120; 721-731.
- [92] Díaz-Morán S, Palència M, Mont-Cardona C, Cañete T, Blázquez G, Martínez-Membrives E, et al. Gene expression in amygdala as a function of differential trait anxiety levels in genetically heterogeneous NIH-HS rats. *Behav Brain Res*, In press.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Means (\pm SEMs) of response latency during the last preshift session and the postshift session in which individual animals reached criterion for RHA-I (H) and RLA-I (L) rats exposed to an incentive downshift (12-2) or to the unshifted control condition (2-2).

FIGURE 2. Molecular pathways of validated genes for RHA-I and RLA-I rats (extracted from Ingenuity Systems, Inc.)

TABLE 1. Up-regulated and down-regulated genes names, and qRT-PCR validation of relevant genes and description (FC: fold change).

FIGURE 1

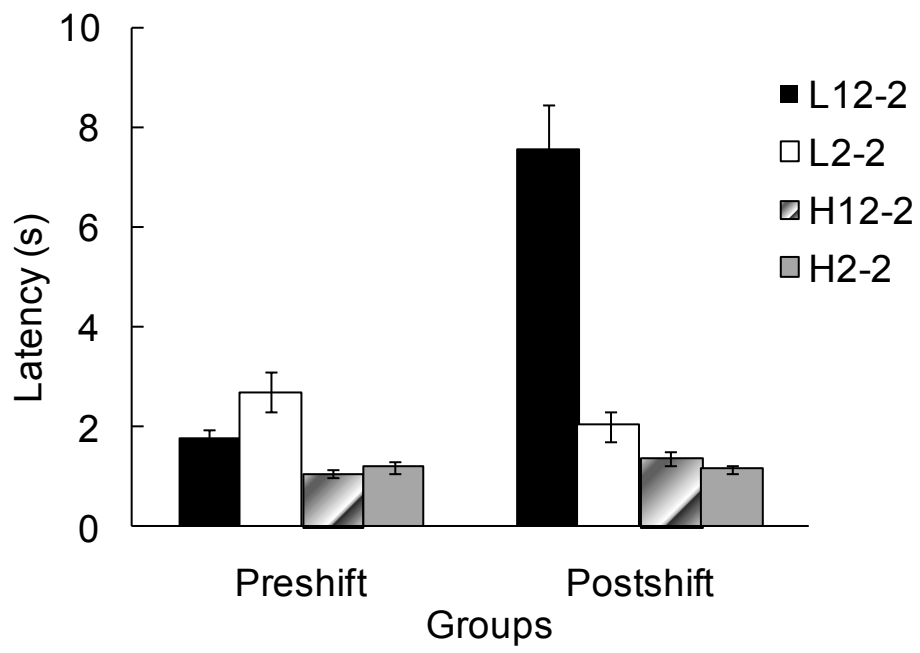


FIGURE 2

New My Pathway 3

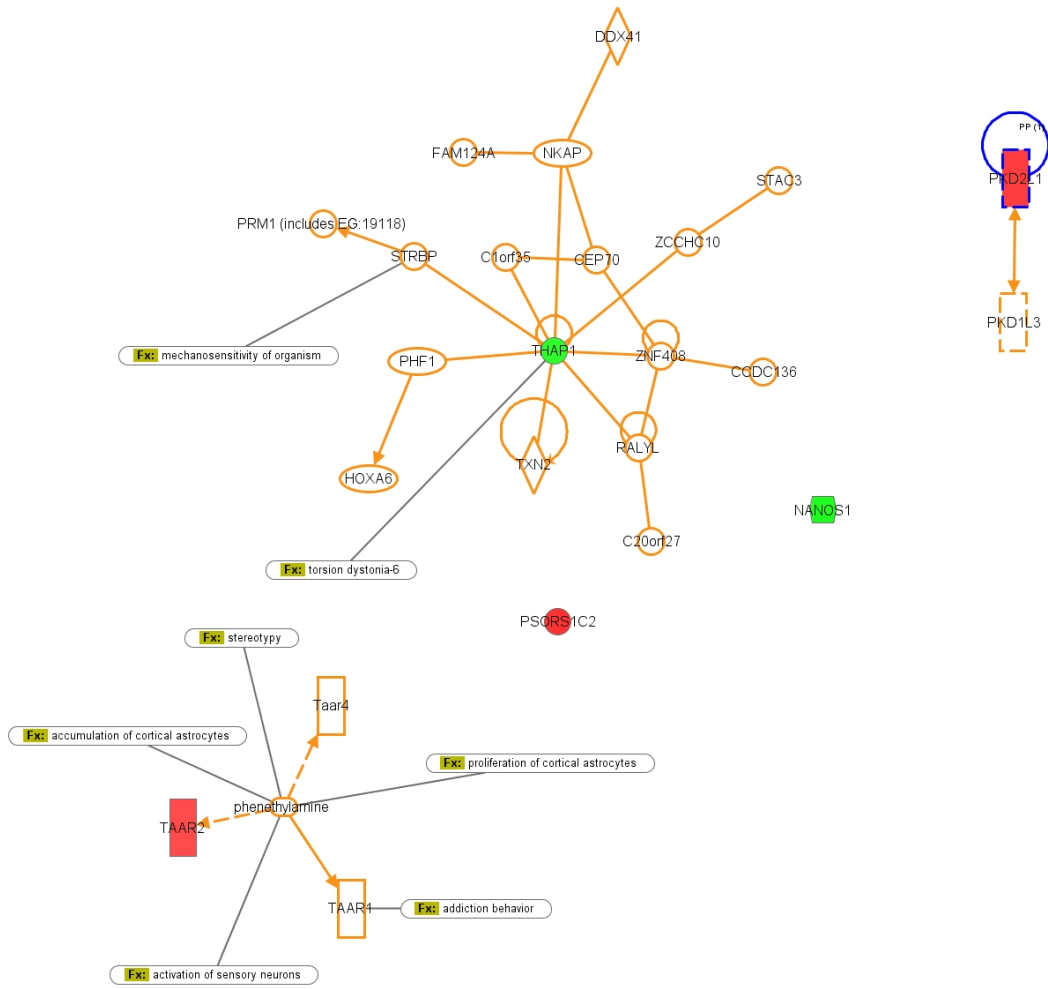


TABLE 1

Group Comparison	Gene Symbol	FC	qRT-PCR	Description
RLA 12-2 vs. RLA 2-2	<i>Psors1c2</i>	5.36	1.43	<i>psoriasis susceptibility 1 candidate 2</i>
	<i>RGD1207937</i>	4.27		similar to hypothetical protein FIJ31348
	<i>RGD1564472</i>	4.14		similar to Transcription elongationfactor B polypeptide 3 binding protein 1
	<i>Thap1</i>	-4.10	-1.64	<i>THAP domain cointaining, apoptosis associated protein 1</i>
	<i>Rab11fip1</i>	-4.23		RAB11 family interacting protein 1
	<i>Fam186b</i>	-4.30		family with sequence similarity 186, member B
	<i>Slamf9</i>	-4.44		SLAM family member 9
	<i>Nanos1</i>	-5.36	-1.74	<i>uncharacterized protein (source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:D4A1F8) [ENSRNOT0000036203]</i>
RLA 12-2 vs. RHA 12-2	<i>Slc45a3</i>	8.71		solute carrier family 45, member 3
	<i>Acsf2h</i>	7.02		acyl-CoA synthetase family member 2
	<i>Rgl2h</i>	6.96	-1.13	<i>regulator of G-protein signaling like 2 homolog</i>
	<i>Tmem212</i>	5.49		transmembrane protein in 212
	<i>Pkd2ll</i>	5.43	1.35	<i>polycystic kidney disease 2-like 1</i>
	<i>Mip</i>	5.26		major intrinsic protein of lens fiber
	<i>Taar2</i>	5.12	1.26	<i>trace amine-associated receptor 2</i>
	<i>Slc35d3</i>	4.93	-1.52	<i>solute carrier family 35, member D3</i>
	<i>Clph</i>	4.81		casein-like phosphoprotein
	<i>Atp6ap1l</i>	4.78		ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 1-like

