



**UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE PSICOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGÍA**

**NEUROCIENCIAS DEL COMPORTAMIENTO**

**IMPLICACIÓN DE LOS SISTEMAS  
ANATÓMICOS DE LA AMÍGDALA EN EL  
APRENDIZAJE INTEROCEPTIVO  
CONCURRENTE: EFECTOS DE LA  
NALOXONA EN LOS PROCESOS  
REGULATORIOS Y ADQUISITIVOS DE  
ORIGEN VISCERAL**

**TESIS DOCTORAL**

**ANTONIO DAVID RODRÍGUEZ AGÜERA  
GRANADA, SEPTIEMBRE DE 2012**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Antonio David Rodríguez Agüera  
D.L.: GR 1067-2013  
ISBN: 978-84-9028-484-1



D. AMADEO PUERTO SALGADO, Catedrático de Psicobiología de la Universidad de Granada.

CERTIFICA:

Que como Director de la Tesis Doctoral “Implicación de los sistema anatómicos de la Amígdala en el Aprendizaje Interoceptivo Concurrente: Efectos de la Naloxona en los procesos regulatorios y adquisitivos de origen visceral” realizada por el doctorando Antonio David Rodríguez Agüera, en el Laboratorio del Departamento de Psicobiología de la Universidad de Granada, ha examinado el mencionado trabajo y hace constar su autorización para que sea presentada en la Facultad de Psicología y se inicien los trámites conducentes a la defensa de la misma.

Y para que así conste, expido el presente, que firmo en Granada, a Septiembre de 2012.

Firmado: D. AMADEO PUERTO SALGADO



El doctorando D. Antonio David Rodríguez Agüera y el director de la tesis D. Amadeo Puerto Salgado garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del los director de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada a 27 de Septiembre de 2012

Director de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

Fdo.:



**IMPLICACIÓN DE LOS SISTEMAS  
ANATÓMICOS DE LA AMÍGDALA EN EL  
APRENDIZAJE INTEROCEPTIVO  
CONCURRENTE: EFECTOS DE LA  
NALOXONA EN LOS PROCESOS  
REGULATORIOS Y ADQUISITIVOS DE  
ORIGEN VISCERAL**

Antonio David Rodríguez Agüera

Departamento de Psicobiología

Neurociencias del Comportamiento

**TESIS DOCTORAL**

**DIRECTOR: D. AMADEO PUERTO SALGADO**

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
SEPTIEMBRE 2012





# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

<b>1. NUTRICIÓN.</b>	15
1.1. SELECCIÓN DE LA DIETA.	15
1.2. LA INGESTA DE ALIMENTOS Y LA SACIACIÓN.	16
1.2.1. Bases Neurales de la Saciación a Corto Plazo.	16
1.2.2. Bases Neuroquímicas de la Ingesta de Alimentos.	25
<b>2. APRENDIZAJE DE DISCRIMINACIÓN GUSTATIVA.</b>	36
2.1. APRENDIZAJE AVERSIVO GUSTATIVO: CARACTERÍSTICAS.	36
2.2. MECANISMOS CEREBRALES IMPLICADOS EN LA ADQUISICIÓN DEL APRENDIZAJE AVERSIVO GUSTATIVO.	38
2.2.1. Transmisión de la Información Gustativa al Sistema Nervioso Central.	38
2.2.2. Transmisión de la Información Olfatoria al Sistema Nervioso Central.	41
2.2.3. Transmisión de la Información Visceral al Sistema Nervioso Central.	42
2.2.4. Las Zonas de Convergencia Viscero-Gusto/Olfatorias como Potencial Base Anatómica del AAvG.	45
2.3. ESTRUCTURAS CEREBRALES IMPLICADAS EN EL APRENDIZAJE AVERSIVO GUSTATIVO.	48
2.3.1. Implicación Funcional del Complejo Parabraquial.	48
2.3.2. Implicación Funcional de la Amígdala.	49
2.4. BASES NEUROQUÍMICAS IMPLICADAS EN EL APRENDIZAJE AVERSIVO GUSTATIVO.	54
<b>3. CONDICIONAMIENTO HACIA UN LUGAR.</b>	56
3.1. CARACTERÍSTICAS DEL CONDICIONAMIENTO HACIA UN LUGAR.	56
3.2. MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS IMPLICADOS EN LA ADQUISICIÓN DEL CONDICIONAMIENTO HACIA UN LUGAR.	57
3.2.1. El Sistema de Recompensa Cerebral.	57
3.2.2. Bases Neurales del Condicionamiento hacia un Lugar.	64
<b>4. HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	68

---

## ESTUDIOS EXPERIMENTALES

**CAPÍTULO I:** IMPLICACIÓN DEL NÚCLEO CENTRAL DE LA AMÍGDALA EN EL APRENDIZAJE INTEROCEPTIVO CONCURRENTES (A CORTO PLAZO) INDUCIDO MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN INTRAGÁSTRICA DE NaCl HIPERTÓNICO.

Introducción.

**EXPERIMENTO 1:** Activación Inmunohistoquímica (*c-fos*) del Núcleo Central de la Amígdala tras la administración intragástrica de NaCl Hipertónico.

Introducción.	79
Materiales y Método.	80
Resultados.	84
Discusión.	86
<b>EXPERIMENTO 2:</b> Efecto de las lesiones en el Núcleo Central de la Amígdala sobre el Aprendizaje Interoceptivo Concurrente: Relevancia de la Información Olfatoria.	89
Introducción.	89
Materiales y Método.	91
Resultados.	96
Discusión.	97
<b>CAPÍTULO II:</b> ACCIÓN REFORZANTE DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DEL NÚCLEO CENTRAL DE LA AMÍGDALA Y DEL NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL EXTERNO EN UNA TAREA DE CONDICIONAMIENTO CONCURRENTES HACIA UN LUGAR: EFECTOS DIFERENCIALES DE LA NALOXONA, UN ANTAGONISTA OPIÁCEO.	101
Introducción.	103
<b>EXPERIMENTO 3:</b> Estimulación Eléctrica Reforzante del Núcleo Central de la Amígdala: Análisis de la administración subcutánea de Naloxona en una tarea de Condicionamiento Concurrente hacia un Lugar.	107
Introducción.	107
Materiales y Método.	109
Resultados.	115
Discusión.	118
<b>EXPERIMENTO 4:</b> Efectos motivacionales de la Estimulación Eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo en una tarea de Condicionamiento Concurrente hacia un Lugar: Bloqueo del efecto reforzante mediante la administración de Naloxona.	121
Introducción.	121
Materiales y Método.	123
Resultados.	125
Discusión.	128
<b>CAPÍTULO III:</b> EL EJE ANATÓMICO VAGAL-PARABRAQUIAL-AMIGDALINO EN LA NUTRICIÓN A CORTO PLAZO: RELEVANCIA DEL SISTEMA OPIÁCEO.	133

Introducción.	135
<b>EXPERIMENTO 5:</b> Participación del Nervio Vago y del Núcleo Parabraquial Lateral Externo en la Nutrición a Corto y a Largo Plazo.	137
Introducción.	137
Materiales y Método.	139
Resultados.	143
Discusión.	148
<b>EXPERIMENTO 6:</b> Efectos de las lesiones del Núcleo Parabraquial Lateral Externo sobre la Re-Ingesta de Comida después de la Extracción Parcial de Contenidos Nutritivos Gástricos.	151
Introducción.	151
Materiales y Método.	153
Resultados.	156
Discusión.	160
<b>EXPERIMENTO 7:</b> Relevancia del Eje Parabraquial (PBl y PBle)-Amigdalino (CeL) en la Ingesta de Sacarosa: Efecto de la administración de Naloxona.	165
Introducción.	165
Materiales y Método.	167
Resultados.	171
Discusión.	178
<b>CAPÍTULO IV: RELEVANCIA OPIÁCEA EN EL APRENDIZAJE AVERSIVO CONCURRENTES Y SECUENCIAL: EFECTOS DE LA NALOXONA.</b>	185
Introducción.	187
<b>EXPERIMENTO 8:</b> Relevancia Opiácea en el Aprendizaje Aversivo Gustativo Concurrente (a Corto Plazo/Implícito): Efectos de la Naloxona.	191
Introducción.	191
Materiales y Método.	192
Resultados.	194
Discusión.	197
<b>EXPERIMENTO 9:</b> Retención del Aprendizaje Aversivo Gustativo Concurrente tras la administración de Naloxona.	201
Introducción.	201

Materiales y Método.	202
Resultados.	203
Discusión.	207
<b>EXPERIMENTO 10: Aprendizaje Aversivo Gustativo Secuencial en animales tratados conNaloxona..</b>	209
Introducción.	209
Materiales y Método.	210
Resultados.	212
Discusión.	213
<b>DISCUSIÓN GENERAL.</b>	217
<b>CONCLUSIONES.</b>	245
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	247

## **INTRODUCCIÓN**



# 1. NUTRICIÓN.

La ingesta de alimentos es un comportamiento motivado multifactorial que tiene por objetivo mantener el equilibrio energético necesario para la supervivencia de los organismos (Zafra *et al.*, 2007; Berthoud, 2008).

Y así, a pesar de que existe una predisposición biológica hacia algunos alimentos (sabores dulces, grasos y salados), los individuos disponen de la capacidad para desarrollar preferencias y aversiones específicas hacia los sabores (Rozin y Shulkin, 1990; Birch, 1999; Touzani y Sclafani, 2002; Myers y Sclafani, 2006). Por ejemplo, los animales pueden aprender a elegir sabores que se asocian con un aporte de calorías y a evitarlos cuando están asociados a enfermedad (Baker y Booth, 1989; Lucas y Sclafani, 1989; Agüero *et al.*, 1993a, b; Cubero y Puerto, 2000a, b; Mediavilla *et al.*, 2000; Sclafani *et al.*, 2001; Zafra *et al.*, 2002; 2005). Es más, tanto los animales como los seres humanos pueden aprender a nutrirse observando el comportamiento de sus congéneres y, de hecho, los roedores suelen preferir sabores que han experimentado previamente en la leche materna o los que huelen en el aliento de otros animales (Galef, 1995; Galef *et al.*, 1997). En esta línea, se ha demostrado que los roedores criados en grupo, en lugar de aislados, son más proclives a consumir dietas sanas (Galef y Wright, 1995).

Esto es, la alimentación es una actividad vitalmente importante que implica comportamientos tanto innatos como adquiridos (Tolkamp *et al.*, 1998; Kyriazakis *et al.*, 1999; Reilly y Bornovalova, 2005).

## 1.1. SELECCIÓN DE LA DIETA.

Un apartado importante dentro de la nutrición es el relacionado con la selección de la dieta (Peters y Harper, 1987; Booth y Baker, 1990; Covasa y Forbes, 1995; Kyriazakis *et al.*, 1999; Simpson y Raubenheimer, 1999; Geurden *et al.*, 2005), un proceso que también incluye el desarrollo de ciertas preferencias como las generadas en los casos de las deficiencias en la alimentación y particularmente en el apetito por el Sodio (Rowland, 1990; Leshem, 1999), algunas vitaminas y minerales esenciales (Harris *et al.*, 1933), o el Calcio (Leshem *et al.*, 1999), el Fósforo (Blair-West *et al.*, 1992) y las Proteínas (Tolkamp *et al.*, 1998; Arsenos y Kyriazakis, 2001).

Sin embargo, aún sin olvidar estos relevantes comportamientos nutritivos (aunque excepcionales), en la mayoría de los casos los animales han de aprender a



elegir y consumir alimentos adecuados, algo que logran a través de la experiencia. Este es el caso de la carencia en Vitamina B1 (Tiamina) que provoca preferencias manifiestas por aquella dieta, entre dos, que la contiene, evitando el consumo de la dieta deficiente (Harris *et al.*, 1933).

## **1.2. LA INGESTA DE ALIMENTOS Y LA SACIACIÓN.**

En la ingesta de alimentos intervienen diversos componentes nutritivos (proteínas, grasas, hidratos de carbono, etc.) así como estructuras centrales y periféricas (Berthoud, 2008; Woods, 2009; Berthoud y Münzberg, 2011) que incluyen dos sistemas: 1) un mecanismo de Retroalimentación Positiva, que depende de los receptores gustativos y olfatorios y que aumenta o mantiene la ingesta actual (Davis y Levine, 1977; Van vort y Smith, 1983; Sclafani, 1995); y 2) un mecanismo de Retroalimentación Negativa, que depende de una gran variedad de receptores digestivos (Deutsch, 1985; Smith *et al.*, 1990; Friedman, 1991) y cuya información tiende a suprimir la ingesta de comida y a acelerar los procesos de Saciación (Swithers y Hall, 1984; Deutsch, 1985; Smith *et al.*, 1990; Grennberg, 1996; Baird *et al.*, 2001a, b).

Con respecto a la supresión de la ingesta se han propuesto dos procesos. El primero es conocido como Saciación (a Corto Plazo) que parece depender de mecanismos neurales y que sería el responsable de la finalización y del volumen de una ingesta. El segundo proceso, Saciedad (a Largo Plazo), parece depender de factores metabólicos y sería el responsable de la inhibición del consumo de comida durante varias horas (Intervalo Inter-Ingesta) (Kaplan *et al.*, 1993; Blundell *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 1999).

### **1.2.1. BASES NEURALES DE LA SACIACIÓN A CORTO PLAZO.**

#### **1.2.1.1. Implicación del Nervio Vago en la Ingesta de Alimentos y la Saciación a Corto Plazo.**

La fuente de señales neurales que regulan la Saciación parecen originarse en alguno/s de los segmentos del sistema digestivo activados antes de que se produzca la absorción (Blundell *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 1999; Schwartz, 2000) y, al parecer, podrían ser procesadas fundamentalmente a través del Nervio Vago (González y Deutsch, 1981; Louis-Sylvestre, 1983; Schwartz y Moran, 1996; Phillips y Powley, 1998; Schwartz *et al.*, 1999; Schwartz, 2000; Peters *et al.*, 2006; Berthoud, 2008).

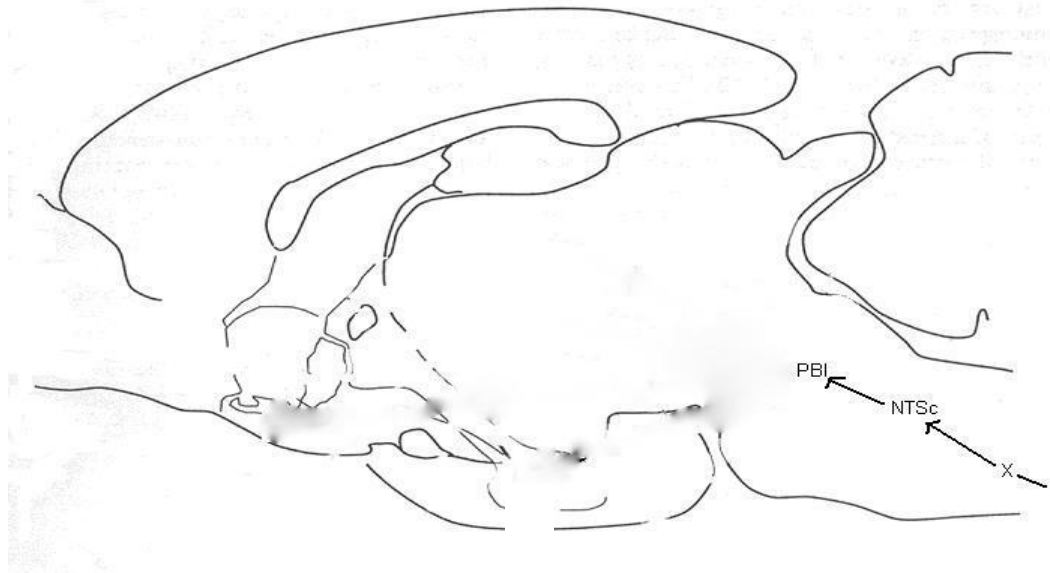
Esta implicación del Nervio Vago ha sido estudiada a través del análisis de la ingesta de comida de animales vagotomizados (Snowdon, 1970; Mordes *et al.*, 1979; González y Deutsch, 1981; Smith *et al.*, 1981; Kral, 1983; Sclafani y Kramer, 1983; Furness *et al.*, 2001; Date *et al.*, 2002; Zafra *et al.*, 2003, 2004, 2006), en unos casos ya recuperados de la intervención quirúrgica (Chavez *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 1999) o, en otros, inmediatamente después de la cirugía vagal, que evita así (en el último de los casos) la posible inclusión de factores de aprendizaje que puedan enmascarar el efecto (Phillips y Powley, 1998; Zafra *et al.*, 2003, 2004).

Estas diferencias procedimentales, además de la utilización de dietas diferentes, explican las discrepancias observadas en la ingesta de comida y sobre la posible función del Nervio Vago (Kelly *et al.*, 1999). Así, mientras en el último de los casos la desaferentización vagal genera un sobreconsumo de alimento (South y Ritter, 1983; Castonguay y Bellinger, 1987; Reidelberger y O'Rourke, 1989; Chavez *et al.*, 1997; Curtis y Stricker, 1997; Phillips y Powley, 1998; Kelly *et al.*, 1999; Zafra *et al.*, 2003, 2004), en otros casos (con experiencia previa) las Vagotomías no afecta a la ingesta (Lorenz, 1983; Kraly *et al.*, 1986; Castonguay y Bellinger, 1997; Chavez *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 1999; Zafra *et al.*, 2003, 2004).

De todos estos datos se ha concluido que los animales desafenrentizados vagalmente carecen de los mecanismos necesarios para regular el proceso de Saciación (a C.P.), cuando existe una ausencia de experiencia previa (dieta no familiar) (Chavez *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 1999, 2000) o cuando, aún disponiendo de experiencia previa (dieta familiar), no disponen de las aferencias sensoriales necesarias para resolver correctamente este proceso (Phillips y Powley, 1998; Zafra *et al.*, 2003, 2004).

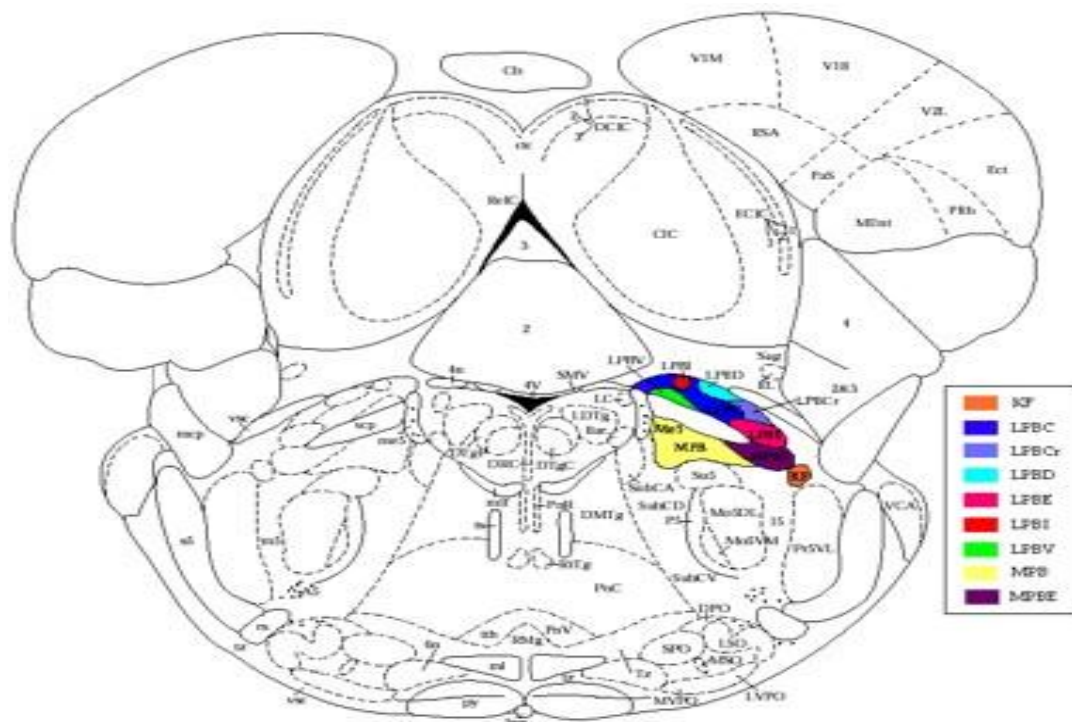
### **1.2.1.2. Implicación del Área Parabraquial en la Ingesta de Alimentos y la Saciación a Corto Plazo.**

Las fibras aferentes vagales viscerosensoriales tienen su primer relevo cerebral en la región caudal del Núcleo del Tracto Solitario (NTSc) (Hyde y Miselis, 1982; Shapiro y Miselis, 1985; Norgren y Smith, 1988; Altschuler *et al.*, 1989, 1992; Barraco *et al.*, 1992). Este región bulbar, a su vez, proyecta hacia el Núcleo Parabraquial Lateral (PBl) fundamentalmente (Loewy y Burton, 1978; Herbert *et al.*, 1990) y, especialmente, a la región lateral externa (PBle) (Loewy *et al.* 1990; Jia *et al.*, 1994; Saper, 1995), lugar donde se concentran las fibras que transportan la información viscerosensorial (Bernard *et al.*, 1993) (Figura 0.1).



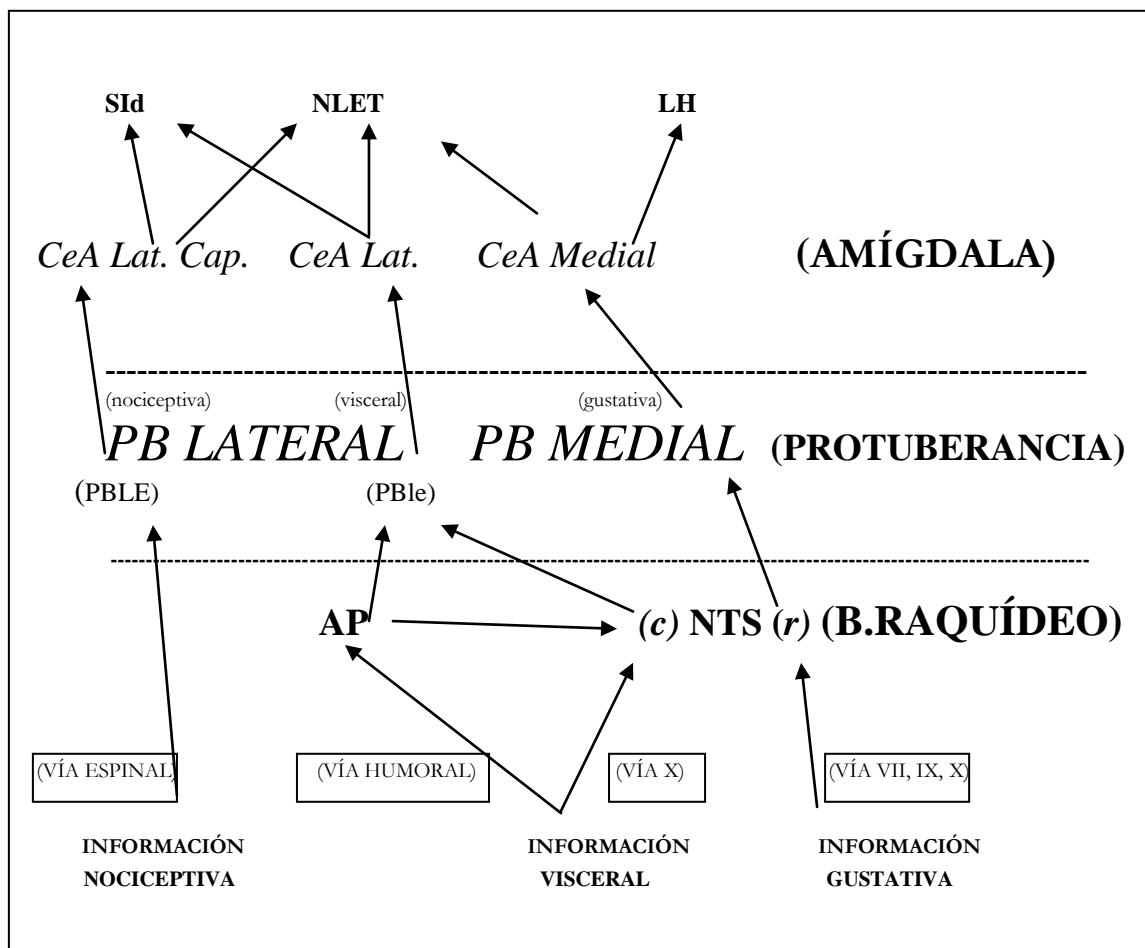
**Figura 0.1:** Localización anatómica aproximada del Núcleo Parabraquial Lateral y transmisión de la información visceral en una visión sagital del cerebro de la rata. *NTSc*: Región Caudal del Núcleo del Tracto Solitario; *PBL*: Núcleo Parabraquial Lateral; *X*: Nervio Vago.

El Complejo Parabraquial en su conjunto está compuesto por una serie de subnúcleos que rodean al Pedúnculo Cerebeloso Superior (PCS) a lo largo de la parte dorsolateral de la Protuberancia (Reilly, 1999) (Figura 0.2).



**Figura 0.2:** Subnúcleos que forman el Complejo Parabraquial (Bregma = -9.16 mm). Abreviaturas: *KF*: Núcleo Kölliker Fuse; *LPBC*: Subnúcleo Parabraquial Lateral Central; *LPBCr*: Subnúcleo Parabraquial Lateral Crescente; *LPBD*: Subnúcleo Parabraquial Lateral Dorsal; *PBL*: Subnúcleo Parabraquial Lateral Externo; *LPBI*: Subnúcleo Parabraquial Lateral Interno; *LPBV*: Subnúcleo Parabraquial Lateral Ventral; *MPB*: Núcleo Parabraquial Medial; *MPBE*, Subnúcleo Parabraquial Medial Externo (adaptado de Paxinos y Watson, 1996).

Con respecto a la región Parabraquial lateral (PBl) (y sus distintos subnúcleos) se trata de un importante relevo anatómico de información viscerosensorial, y también nociceptiva, que ha sido relacionada con funciones tales como nutrición, sed, regulación endocrina, dolor y analgesia, conducta emocional, etc. (Herbert *et al.*, 1990; Moga *et al.*, 1990; Bernard *et al.*, 1993; Krout y Loewy, 2000; De Gobbi *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2004). En particular, el subnúcleo lateral externo (PBle) ha sido implicado en el procesamiento de la información viscerosensorial, mientras que la lámina rostral del subnúcleo lateral (PBvl) participa sobre todo en el procesamiento gustativo (al igual que el Núcleo Parabraquial Medial, PBm). El resto del PB externo lateral participa en los procesos respiratorios, cardiovasculares y nociceptivos (Bernard *et al.*, 1993) (Figura 0.3).



**Figura 0.3:** Distribución neural de la vía visceral, gustativa y nociceptiva. AP: Área Postrema; CeA: Núcleo Central de la Amígdala; LH: Hipotálamo Lateral; NLET: Núcleo Lecho de la Estria Terminal; NTSc: Parte Caudal del Núcleo del Tracto Solitario; NTSr: Parte Rostral del Núcleo del Tracto Solitario; Sid: Sustancia Innominada Dorsal; PB: Núcleo Parabraquial; PBLE: Parte Externa del Núcleo Parabraquial Lateral; Pble: Parte Más Externa del Núcleo Parabraquial Lateral; Protub.: Protuberancia; Vía VII: Nervio Facial; IX: Nervio Glosofaríngeo; X: Nervio Vago.

A partir de los subnúcleos del PBl surge un importante haz de proyecciones, organizadas topográficamente, que se dirige a la Amígdala (concretamente hacia el Núcleo Central de la Amígdala; CeA) (Fulwiler y Saper, 1984; Bernard *et al.*, 1991, 1993; Jia *et al.*, 1994; Cassell *et al.*, 1999), de la cual reciben, a su vez, aferencias recíprocas (Petrovich y Swanson, 1997) (Figura 0.3). Todo ello convierte al eje PBl-Amígdala en un candidato idóneo de cara a los diversos procesos motivacionales (Le Magnen, 1992), por ejemplo, de índole nutritivo (Suemori *et al.*, 1994; Baird *et al.*, 2001a, b).

Por otra parte, el área PBl mantiene otras interconexiones bidireccionales con circuitos cerebrales implicados en los procesos alimenticios normales. Esta red neural incluye al Núcleo Paraventricular Hipotalámico (PV), al Núcleo Central de la Amígdala (CeA) y al Núcleo del Tracto Solitario (NTS) (Norgren, 1976; Fulwiler y Saper, 1984; Herbert *et al.*, 1990; Moga *et al.*, 1990; Bernard *et al.*, 1993; Karimnamazi *et al.*, 2002). En resumen, este complejo anatómico podría ser considerado una región diana donde las aferencias viscerosensoriales de segundo orden, procedentes de esas estructuras relacionadas con la alimentación, pueden converger e interactuar fisiológicamente (Hermann y Rogers, 1985; Baird *et al.*, 2001a, b; Karimnamazi *et al.*, 2002).

Asimismo, el área PB Medial (PBm) parece ser también uno de los principales relevos anatómicos en el procesamiento de señales gustativas (Fulwiler y Saper, 1984; Halsell y Travers, 1997; De Lacalle y Saper, 2000; Karimnamazi *et al.*, 2002), tan importante en la regulación de la ingesta (Calingasan y Ritter, 1993; Ritter *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1999; Yamamoto y Sawa, 2000b).

Lesiones del Complejo Parabraquial en general (Yamamoto *et al.*, 1995) y del PBl en particular (Takaki *et al.*, 1990; Zafra *et al.*, 2005) suelen provocar comportamientos hiperfágicos. Más aún, lesiones subtotales del PBl, que incluyen al PBle, producen también un efecto hiperdípico (Ohman y Johnson, 1986, 1989; Edwards y Johnson, 1991).

En cualquier caso, numerosas investigaciones han tratado de determinar más específicamente la implicación precisa del PBl en las distintas funciones de la ingesta. Así, por ejemplo, el PBl, y probablemente el PBle, se ha mostrado como una de las zonas diana para diversos fármacos relacionados con el control y la modulación de la ingesta y, entre ellos, el 2,5-Anhidro-D-Manitol (Grill *et al.*, 1995), la Fenfluramina (Li y Rowland, 1993, 1995; Li *et al.*, 1994; Grill *et al.*, 1997; Rowland *et al.*, 2000;

Trifunovic y Reilly, 2001, 2006; Simansky y Nicklous, 2002), la Colicistoquinina (CCK) (Takaki *et al.*, 1990; Li y Rowland, 1994, 1995; Trifunovic y Reilly, 2001), las Anfetaminas (Sakai y Yamamoto, 1997), la Galanina (Koegler *et al.*, 1999), la Secretina (Cheng *et al.*, 2011) o los agentes Opiáceos (Ding *et al.*, 1996; Wolinsky *et al.*, 1996; Gutstein *et al.*, 1998; Chamberlin *et al.*, 1999; Bray, 2000; Wilson *et al.*, 2003). Igualmente podría estar implicado en la acción hiperfágica del Mercaptoacetato (Calingasan y Ritter, 1993; Trifunovic y Reilly, 2002) o de las Benzodiazepinas (Higgs y Cooper, 1996a; Söderpalm y Berridge, 2000). De hecho, las lesiones del PBl (que incluyen al PBle) bloquean las acciones de estos agentes farmacológicos o endocrinos sobre la ingesta (Calingasan y Ritter, 1993; Trifunovic y Reilly, 2001; Becskei *et al.*, 2007). Más aún, la activación del PBl tras la administración de estos agentes junto con la modificación de la ingesta que éstos inducen puede ser bloqueada o atenuada tras la aplicación de Vagotomías (Smith *et al.*, 1981; Ritter *et al.*, 1994; Li y Rowland, 1995; Horn *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2004; Abbott *et al.*, 2005).

El PBl podría también estar implicado en la ingesta de agua (Edwards y Johnson, 1991; Menani *et al.*, 1996; De Gobbi *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2004), así como en la inhibición del apetito de sal (Menani *et al.*, 2002), además de en los mecanismos sensoriales y asociativos tanto de las aversiones como de las preferencias gustativas (Agüero *et al.*, 1993a, b; Cubero y Puerto, 2000a; Reilly y Trifunovic, 2000a, b, 2001; Sclafani *et al.*, 2001; Zafra *et al.*, 2002, 2005).

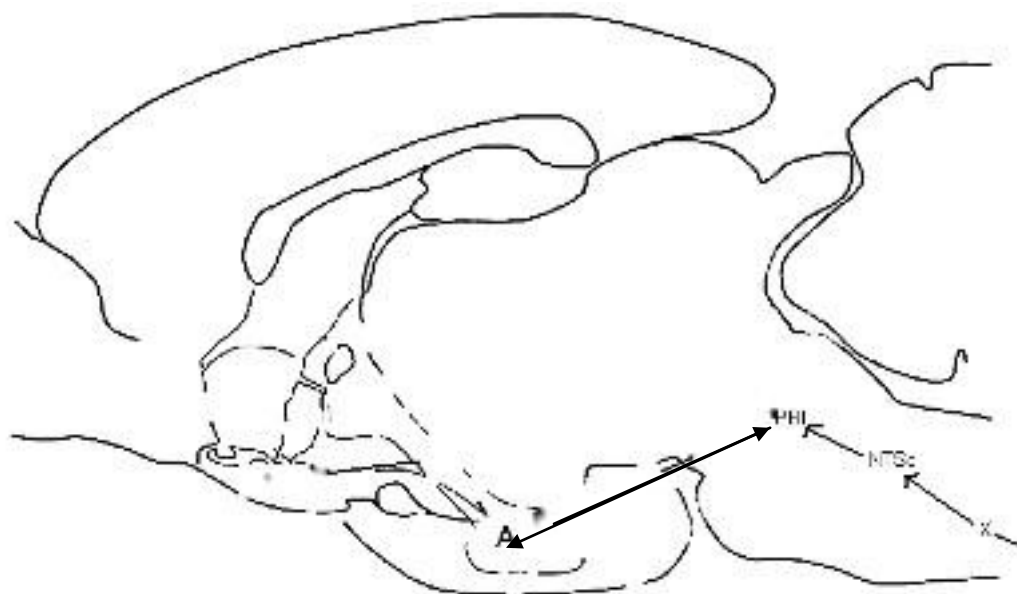
Asimismo, estudios inmuistoquímicos han demostrado la activación del PBle, entre otras estructuras, después de diversos tratamientos viscerales como, por ejemplo, la distensión gástrica (Suemori *et al.*, 1994; Baird *et al.*, 2001a,b; Berthoud *et al.*, 2001; Vrang *et al.*, 2003; Mazda *et al.*, 2004), la ingesta de comida y de soluciones gustativas (Yamamoto *et al.*, 1993, 1994b; Rinaman *et al.*, 1998; Emond *et al.*, 2001), o la administración de nutrientes directamente en el estómago (Kobashi *et al.*, 1993; Yamamoto y Sawa, 2000a, b; Emond *et al.*, 2001) o el duodeno (Mönnikes *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999; Berthoud *et al.*, 2001; Emond *et al.*, 2001). Estos efectos pueden ser eliminados o significativamente atenuados tras las lesiones del Nervio Vago (Mönnikes *et al.*, 1997; Yamamoto y Sawa, 2000a, b; Mazda *et al.*, 2004)

Finalmente, la Estimulación Eléctrica del Nervio Vago induce inmunorreactividad *c-fos*, entre otros núcleos, en el PBle (Saleh y Cechetto, 1993; Gieroba y Blessing, 1994), mientras que la presencia de nutrientes en el intestino combinado con la liberación de hormonas como la Colicistoquinina generan señales

que son procesadas a través de la vía Vagal-PBle (Li y Rowland, 1995).

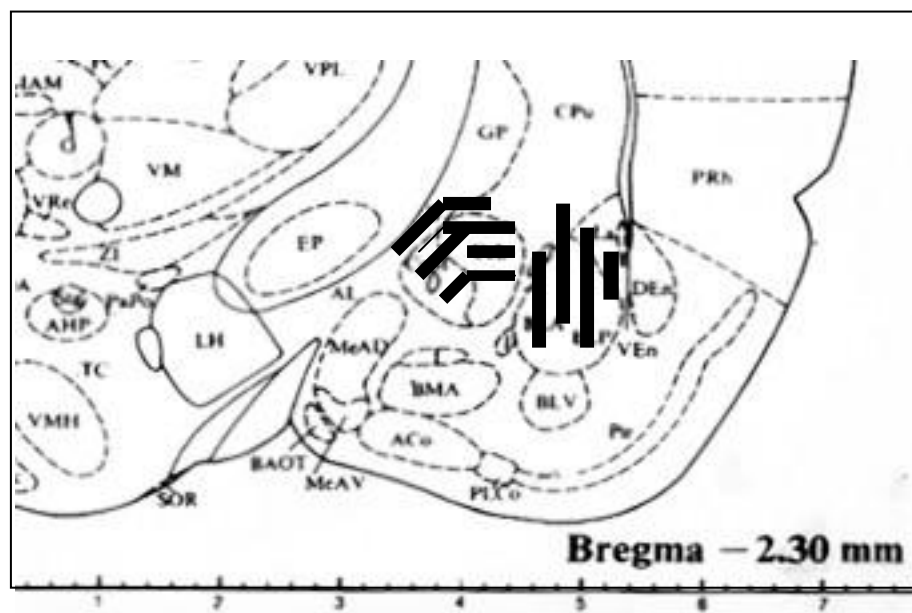
### 1.2.1.3. Implicación de la Amígdala en la Ingesta de Alimentos y la Saciación a Corto Plazo.

Como se ha comentado en el apartado anterior, desde los distintos subnúcleos del PBI surgen importantes proyecciones, organizadas topográficamente, hacia la Amígdala (Fulwiler y Saper, 1984; Bernard *et al.*, 1991, 1993; Jia *et al.*, 1994; Cassell *et al.*, 1999). Estas conexiones son recíprocas desde esta misma estructura límbica (Petrovich y Swanson, 1997) (Figura 0.4).



**Figura 0.4:** Localización anatómica aproximada de la Amígdala y transmisión de la información visceral en una visión sagital del cerebro de la rata. A: Amígdala; NTSc: región caudal del Núcleo del Tracto Solitario; PBL: Núcleo Parabraquial Lateral; X: Nervio Vago.

La Amígdala (o Complejo Amigdalino) es una estructura telencefálica que está compuesta por un grupo heterogéneo de núcleos, tanto a nivel citoarquitectónico como histoquímico, así como de conectividad con otros núcleos y estructuras corticales (De Olmos, 1990; Price, 1990; Amaral *et al.*, 1992; Alheid *et al.*, 1995) (Figura 0.5).



**Figura 0.5:** Localización anatómica de los principales subnúcleos de la Amígdala en una visión transversal del cerebro de la rata. *ACo*: núcleo cortical anterior de la amígdala; *BLA*: núcleo basolateral anterior de la amígdala (líneas verticales); *BLP*: núcleo basolateral posterior de la amígdala (líneas verticales); *BMA*: núcleo basomedial anterior de la amígdala; *CeL*: núcleo central lateral de la amígdala (líneas horizontales); *CeM*: núcleo central medial de la amígdala (líneas oblicuas); *La*: núcleo lateral de la amígdala; *MeAD*: núcleo medial anterior dorsal de la amígdala; *MeAV*: núcleo medial anterior ventral de la amígdala; *PLCo*: núcleo cortical posterolateral de la amígdala (cogido de Paxinos y Watson, 1986).

Desde una perspectiva general, la Amígdala consta de tres grandes divisiones funcionales: Basolateral, Central y Corticomediales (Martín, 1997). Los Núcleos Basolaterales comprenden la mayor división de la Amígdala (Núcleos Corticales) y se considera que a través de sus conexiones directas con la Formación del Hipocampo (FHC) atribuye significado emocional a estímulos complejos durante el proceso de aprendizaje (Martín, 1997).

Por su parte, los Núcleos Centrales (particularmente el CeA) conectan con el Sistema Nervioso Autónomo (SNA) a través de las proyecciones viscerosensoriales que recibe desde los núcleos del Tronco Cerebral (NTS y PB) y de proyecciones hipotalámicas (Martín, 1997).

La tercera de las divisiones principales de la Amígdala es la correspondiente a los Núcleos Corticomediales (particularmente el Me, ACo y PLCo), que se encuentran conectados recíprocamente con el Bulbo Olfatorio (Martín, 1997). Esta División Corticomediales también proyecta hacia el Núcleo Ventromedial del Hipotálamo (VMH), el cual está implicado en una gran variedad de funciones generalmente asociadas a la motivación.

Los subnúcleos del área PBL proyectan a distintos subnúcleos del Núcleo Central de la Amígdala (CeA) (Norgren, 1976; Saper y Lowey, 1980; Ottersen, 1981; Fulwiler



y Saper, 1984; Moga *et al.*, 1990; Bernard *et al.*, 1993). Así, por ejemplo, el subnúcleo Central Lateral (CeL) es la diana del PBle, el subnúcleo Central Medial (CeM) constituye la proyección principal del PBvl (información gustativa) mientras que en el subnúcleo Central Lateral Capsular (CeLc) terminan el resto de las células del PB Externo Lateral (información nociceptiva) (Bernard *et al.*, 1993) (Figura 0.3). A su vez, cada uno de estos subnúcleos amigdalinos proyecta individualmente hacia diversas estructuras cerebrales rostrales (Krettek y Price, 1978; Seller y Smith, 1982; Sun *et al.*, 1991; Petrovich y Swanson, 1997; Bourgeais *et al.*, 2001) (Figura 0.3).

En resumen, el eje visceral vagal que se origina en el sistema gastrointestinal, alcanza el NTSc (Contreras *et al.*, 1980; Hyde y Miselis, 1982; Norgren y Smith, 1988) y proyecta al PBle (Papas y Ferguson, 1990; Halsell y Travers, 1997; De Lacalle y Saper, 2000; Karimnamazi *et al.*, 2002) para terminar finalmente en el CeL de la Amígdala (Bernard *et al.*, 1993; Bourgeais *et al.*, 2001) (Figura 0.3).

De acuerdo con estos datos anatómicos, la Amígdala ha sido implicada en la integración de las señales gustativas, hedónicas y autonómicas relacionadas con la ingesta de comida (Pomonis *et al.*, 2000). Así, sus lesiones provocan un incremento en la ingesta de comida y en el peso corporal en algunas especies animales, particularmente en gatos (Morgane y Kosman, 1957), perros (Fonberg, 1971) y monos (Bucy y Klüver, 1955), aunque los resultados con roedores no han sido siempre consistentes (King *et al.*, 1993a, b).

De hecho, mientras que los estudios iniciales, utilizando lesiones amplias que destruían la totalidad de la Amígdala, mostraban hipo-fagia y pérdida de peso (Anand y Brobeck, 1952; Koikegami, 1964; Schwartz y Kling, 1964; Pubols, 1966; Collier y Gault, 1969; Stoller, 1972), los estudios posteriores, con lesiones restringidas del Núcleo Basolateral (BLA) y/o Lateral (LA), obtuvieron resultados contradictorios con ganancias de peso, en unos casos (Box y Mogenson, 1975; Leonard *et al.*, 1982; Ganaraj y Jeganathan, 1998), y ausencia de efectos (Rolls y Rolls, 1973; Fitzgerald y Burton, 1981; Schoenfeld y Hamilton, 1981; King *et al.*, 1994) o, incluso, pérdida de peso en otros casos (Crow y Whitaker, 1970).

Estudios específicos, centrados en los Núcleos Corticomediales de la Amígdala, mostraron resultados igualmente contradictorios, con ganancias de peso, en unos casos (Grossman y Grossman, 1963) y pérdida de peso (Collier y Gault, 1969) o ausencia de cambios en el peso corporal, en otros (Schoenfeld y Hamilton, 1981; Sclafani *et al.*, 1970).

Por último, las lesiones localizadas en el Núcleo Central de la Amígdala (CeA) también han mostrado hiperfagia y/o ganancia de peso (Box y Mogenson, 1975; Leonard y Hahn, 1982; Bovetto y Richard, 1995), afagia y/o pérdida de peso (Cole, 1974; Box y Mogenson, 1975; Ganaraj y Jeganathan, 1998), así como ausencia de efecto sobre la ingesta de comida y peso corporal en los distintos estudios (Dacey y Grosman, 1977; Kemble *et al.*, 1979; Schoenfeld y Hamilton, 1981; Ritter y Hutton, 1995).

## **1.2.2. BASES NEUROQUÍMICAS DE LA INGESTA DE ALIMENTOS.**

El análisis sobre la implicación de las estructuras cerebrales en la conducta alimenticia suele implicar también el examen de la participación de los sistemas neuroquímicos relacionados. Aquí, las Benzodiazepinas (BZD) (Cole, 1983; Posadas-Andrews *et al.*, 1983; Berridge y Treit, 1986; Berridge y Peciña, 1995; Higgs y Cooper, 1996a, b; Peciña y Berridge, 1996), el Sistema Cannabinoide (CB) (Williams *et al.*, 1998; Williams y Kirkham, 1999; Harrold *et al.*, 2002; Kirkham *et al.*, 2002; Tanda y Goldberg, 2003) y el Sistema Opiáceo (Kirkham y Blundell, 1986; Higgs y Cooper, 1997; Glass *et al.*, 1999b; Zhang y Kelley, 2000, 2002; Frisina y Sclafani, 2002; Koob *et al.*, 2003) son, al parecer, algunos de los moduladores neuroquímicos principales de la nutrición.

### **1.2.2.1. Implicación del Sistema Opiáceo en la Ingesta de Alimentos.**

Los opiáceos endógenos pueden ser sintetizados tanto en el Sistema Nervioso Central (SNC) como en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) (Cota *et al.*, 2006). Sus efectos fisiológicos y comportamentales afectan a una amplia gama de funciones, incluyendo la nocicepción, memoria, movilidad gástrica, estado inmune, secreción hormonal e ingesta de comida (Bodnar y Klein, 2004). Con respecto a la implicación del Sistema Opiáceo en el comportamiento alimenticio son numerosos los estudios que han relacionado a los opiáceos con este proceso fisiológico (Lynch *et al.*, 1985; Carr *et al.*, 1991; Moufid-Bellancourt y Velley, 1994; Wolinsky *et al.*, 1996; Giraudo *et al.*, 1998; Nicklous y Simansky, 2003; Trifunovic y Reilly, 2001; Yeomans y Gray, 2002; Wilson *et al.*, 2003), en interacción con otros agentes reguladores de la alimentación como, por ejemplo, las Benzodiazepinas, el Sistema Cannabinoide, o la Colicistoquinina, entre otros (Pittman *et al.*, 1980; Marsicano y Lutz, 1999; Wiesenfeld-Hallin *et al.*, 1999; Kirkham y Williams, 2001; Di *et al.*, 2003; Verty *et al.*,

2003; Chen *et al.*, 2004; Richardson *et al.*, 2005; Levine, 2006).

En general, los agentes opiáceos modifican el consumo de comida y la regulación hidromineral, incrementándolo cuando son activados los receptores opiáceos (agonistas) y disminuyéndolo al resultar bloqueados dichos receptores (antagonistas) (Reid, 1985; Kirkham y Blundell, 1986; Carr *et al.*, 1991; Doyle *et al.*, 1993; Glass *et al.*, 1999b, 2000; Zhang y Kelley, 2002; Wilson *et al.*, 2003).

De acuerdo con la bibliografía disponible se han ofrecido diversas propuestas explicativas acerca de la acción antagonista en los receptores opiáceos y sobre su efecto en la reducción de la ingesta:

### **A) Potencial acción aversiva de los antagonistas opiáceos.**

Así, para algunos autores la acción de los antagonistas opiáceos en la supresión de la ingesta estaría relacionada con su acción aversiva intrínseca (Schaefer y Michael, 1981, 1985, 1988; Mucha *et al.*, 1985; Kelsey *et al.*, 1984; Bielajew *et al.*, 2003; Shoblock y Maidment, 2006), o lo que es lo mismo, con una disminución de la actividad recompensante del Sistema Opiáceo (Kelley *et al.*, 2002). Esta propuesta estaría relacionada con el hecho de que la administración de antagonistas opiáceos, como la Naloxona (dosis mayores o iguales de 2 mg/kg), induce Condicionamientos Aversivos hacia un Lugar (CAL) (Mucha *et al.*, 1982; Mucha *et al.*, 1985; Stolerman, 1985; Shoblock y Maidment, 2006) y también desarrollan Aprendizajes Aversivos Gustativos (AAvG) hacia los estímulos gusto-olfatorios con los que son asociadas (Stolerman, 1985; Mucha *et al.*, 1995). Estos fármacos incrementan igualmente el umbral de la Auto-Estimulación Eléctrica Intra-Cerebral (AEEIC) (Stein y Belluzzi, 1978; Schaefer y Michael, 1981, 1985, 1988; Kelsey *et al.*, 1984; Bielajew *et al.*, 2003), suprimen las respuestas operantes para obtener comida (Rudski *et al.*, 1997) y la respuesta locomotora (Brady y Holtzman, 1981), al tiempo que provocan un aumento en la actividad neuronal de estructuras que han sido relacionadas con el procesamiento aversivo (por ejemplo, PB, CeA, NLET, etc.) (Georges *et al.*, 2000; Gestreau *et al.*, 2000; Le Guen *et al.*, 2001; Hamlin *et al.*, 2001, 2004; Veinante *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2005).

Estos autores consideran que el antagonismo del Sistema Opiáceo y la consiguiente supresión de la ingesta puede deberse a que tanto las Benzodiazepinas (Cole, 1983; Posadas-Andrews *et al.*, 1983; Berridge y Treit, 1986; Berridge y Peciña, 1995; Higgs y Cooper, 1996a, b; Peciña y Berridge, 1996), como el Sistema

Cannabinoide (CB) (Williams *et al.*, 1998; Williams y Kirkham, 1999; Harrold *et al.*, 2002; Kirkham *et al.*, 2002; Tanda y Goldberg, 2003) o el propio Sistema Opiáceo (Kirkham y Blundell, 1986; Higgs y Cooper, 1997; Glass *et al.*, 1999b; Zhang y Kelley, 2000, 2002; Frisina y Sclafani, 2002; Koob *et al.*, 2003) ejercen efectos positivos sobre la ingesta al incrementar el impacto hedónico de las soluciones apetitivas y recompensantes. En otras palabras, la actuación de cada uno de estos tres sistemas neurobiológicos haría que los animales valoraran la comida en mayor grado (aumento del “valor de incentivo positivo estimular”), facilitando así el consumo de alimentos (Richardson *et al.*, 2005).

Existen datos que ponen de manifiesto que las Benzodiacepinas interactúan con los péptidos opiáceos endógenos a la hora de ejercer sus efectos sobre los sistemas de recompensa y motivación (hiperfagia) (Billingsley y Kubena, 1978; Stapleton *et al.*, 1979; Cooper, 1980, 1983; Koob *et al.*, 1980; Birk y Noble, 1981; Naruse *et al.*, 1988; Higgs y Cooper, 1997; Kelley *et al.*, 2000; Navarro *et al.*, 2004), un efecto que puede ser bloqueado por antagonistas opiáceos tales como la Naloxona o la Naltrexona (Stapleton *et al.*, 1979; Birk y Noble, 1981; Cooper, 1983; Naruse *et al.*, 1988; Higgs y Cooper, 1997; Kelley *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2005).

Igualmente, existen estudios que sugieren que los Cannabinoides y los Opiáceos podrían utilizar mecanismos similares para modular procesos fisiológicos, tales como de nocicepción, el comportamiento motor, la recompensa o el apetito (Manzanares *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 2001), observándose una manifiesta interacción entre estos sistemas con respecto a la regulación de la ingesta de comida (Kirkham y Williams, 2001; Williams y Kirkham, 2002; Allen *et al.*, 2003; Verty *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004; Cota *et al.*, 2006).

En resumen, de acuerdo con esta hipótesis, los antagonistas de los receptores opiáceos provocarían la supresión de la ingesta al disminuir las propiedades oro-sensoriales hedónicas de las soluciones apetitivas (Kirkham y Cooper, 1988a, b; Parker *et al.*, 1992; Yeomans y Gray, 1997, 2002; Yu *et al.*, 1999; Richardson *et al.*, 2005).

Así, se ha comprobado que la Naloxona disminuye la ingesta de soluciones apetitivas dulces con mayor efectividad que, por ejemplo, el consumo de agua (Levine *et al.*, 1982). También se ha observado que la Naloxona disminuye en mayor medida la ingesta de dietas preferidas con respecto a las dietas no preferidas, independientemente de la composición de éstas (Glass *et al.*, 1996). Más aún, la

administración de agonistas opiáceos (por ejemplo, DAMGO) aumenta la ingesta de soluciones apetitivas dulces pero no la de agua (Zhang y Kelley, 1997, 2002). Finalmente, la Naltrexona disminuye la ingesta de comida sólida asociada con Sacarosa con mayor efectividad que la comida normal (Marks-Kaufman *et al.*, 1984). Esta reducción en las propiedades hedónicas de la Sacarosa después de la administración de Naltrexona también se ha observado en seres humanos (Bertino *et al.*, 1991).

El uso de modelos animales manipulados genéticamente ha validado, en gran medida, la implicación del Sistema Opiáceo en la preferencia de soluciones apetitivas, mostrándose que los roedores carentes de receptores opiáceos  $\mu$  prefieren una solución dulce en menor medida que los animales (de control) normales (Yirmiya *et al.*, 1988; Papaleo *et al.*, 2007).

Las investigaciones que han relacionado a los opiáceos con la ingesta de comida preferida en función de mecanismos oro-sensoriales recompensantes han utilizados como procedimiento técnicas de Alimentación Ficticia (una alimentación sólo con información sensorial oro-faríngea normal). Mediante este procedimiento se pueden disociar la aportación oro-sensorial y post-ingestiva en la ingesta de comida (Glass *et al.*, 1999b), demostrando que la Naloxona disminuye particularmente la Alimentación Ficticia con Sacarosa, lo cual sugiere que el antagonismo opiáceo podría estar relacionado estrechamente con los mecanismos oro-sensoriales (Rockwood y Reid, 1982; Kirkham y Cooper, 1988a, b; Kirkham, 1990).

La implicación oro-sensorial también se ve apoyada por el hecho de que los opiáceos son relevantes en el consumo de comida independientemente de la carga nutritiva de estos alimentos, y así la Naltrexona disminuye la ingesta incluso de soluciones no nutritivas, como por ejemplo la Sacarina (Beczowska *et al.*, 1993) o el Cloruro de Sodio (NaCl) (Bodnar *et al.*, 1995).

A favor de la implicación del Sistema Opiáceo en los procesos oro-sensoriales de la conducta alimenticia se pueden incluir también los estudios llevados a cabo mediante el Test de Reactividad Gustativa de Norgren en el cual se examinan las reacciones oro-faciales estereotipadas de carácter hedónico que se producen en respuesta a las administraciones orales pasivas (Berridge, 1996). En estos estudios se ha confirmado que los antagonistas opiáceos disminuyen la reactividad facial positiva a los estímulos dulces apetitosos (por ejemplo, Sacarosa) sin afectar, por otra parte, a las reacciones negativas típicas ante los estímulos no apetecibles (por ejemplo,

Quinina) (Parker *et al.*, 1992; Berridge, 1996; Söderpalm y Berridge, 2000).

De acuerdo con esta Hipótesis Hedónica existen numerosos estudios a favor de considerar a los antagonistas opiáceos como supresores específicos de la respuesta placentera característica de las soluciones apetitivas. El Sistema Opiáceo Endógeno sería el mecanismo responsable de que las comidas apetitivas resulten más placenteras que las menos atractivas nutritivamente y, por ende, que se consuman en mayor cantidad. Algunos autores sugieren que la implicación opiácea en la alimentación estaría relacionada más con los aspectos recompensantes de la alimentación que con los relacionados con las necesidades energéticas (Levine y Billington, 1997).

El hecho de que el consumo de Sacarosa sea considerado como reforzante y, al mismo tiempo, que las vías de recompensa en el cerebro puedan implicar opiáceos endógenos, ha llevado a hipotetizar que probablemente el consumo de Sacarosa también podría inducir una liberación de opiáceos endógenos (Pomonis *et al.*, 2000). En este sentido se ha demostrado que el consumo de sustancias dulces, altamente sabrosas, causa una inmediata liberación de opiáceos endógenos en el cerebro de animales no privados (Welch *et al.*, 1996), al tiempo que provocan un mayor aumento de éstos si se compara con la ingesta de agua (Yamamoto *et al.*, 2000). También se ha puesto de manifiesto que un “estado de privación hedónica” implicaría al Sistema Opiáceo Endógeno, ya que si se sustituye una dieta altamente apetitiva a la que los animales están habituados por otra menos atractiva, los niveles de opiáceos endógenos disminuirían (Levine y Billington, 2004).

Existen otros estudios que apoyarían esta idea a partir de observaciones en las que algunos los efectos de la Naloxona se van incrementados después del consumo de sustancias apetitivas (Pomonis *et al.*, 2000). Así, por ejemplo, animales a los que se les permitía tomar una solución de Sacarosa mostraban posteriormente una sensibilidad aumentada a los efectos supresivos de la Naloxona (Levine y Billington, 1989; Kanarek *et al.*, 1997). Igualmente, la administración de Naloxona a animales que habían sido alimentados crónicamente con Glucosa (Colantuoni *et al.*, 2001) o Sacarosa (Rudski *et al.*, 1997) induce cambios conductuales propios del Síndrome de Retirada Opiácea y además incrementa la habilidad del antagonista opiáceo para inhibir respuestas operantes para obtener una comida recompensante. Estos hechos apoyan la idea, por tanto, de que la pre-exposición a sustancias dulces aumenta las propiedades anoréxicas de la Naloxona (Levine y Billington, 1989; Kanarek *et al.*,

1997).

En este sentido, se ha comprobado que la ingesta aguda de Sacarosa facilita la liberación inmediata de opiáceos endógenos, afectando a una gran variedad de comportamientos, además del alimenticio (Ren *et al.*, 1997; Blass y Hoffmeyer, 1991; Barr *et al.*, 1995). Se ha observado que los animales que reciben intra-oralmente una solución de Sacarosa (7,5%) muestran una disminución en la sensibilidad al dolor (Ren *et al.*, 1997). Similares efectos analgésicos de la Sacarosa han sido observados en niños (Blass y Hoffmeyer, 1991; Barr *et al.*, 1995). Más aún, el consumo agudo o crónico de Sacarosa genera un aumento (Kanarek *et al.*, 1991; Blass, 1997) o disminución (D'Anci *et al.*, 1996) de las propiedades analgésicas de la Morfina. Esos efectos sobre la analgesia inducida por Morfina son aparentemente específicos de la dieta, con Sacarosa o Carbohidratos en general, ya que otras manipulaciones en el ámbito de las Proteínas, Vitaminas o Minerales no muestran efecto alguno (Kanarek *et al.*, 1999). Por el contrario, el cese en el consumo de Sacarosa por parte de los animales morfina-dependientes incrementa la severidad de los Síntomas de Abstinencia inducidos por la Naloxona (Schoenbaum *et al.*, 1990).

Conjuntamente, todos estos resultados sugieren que los antagonistas opiáceos podrían estar particularmente implicados en las reacciones hedónicas propias de la activación oral, sin afectar al procesamiento post-ingestivo posterior (Glass *et al.*, 1999b). Para explicarlo se ha sugerido que los antagonistas opiáceos podrían bloquear la capacidad para discriminar entre lo dulce y lo no dulce, de modo que el significado placentero podría verse disminuido. Sin embargo, se ha comprobado que la Naloxona no altera la discriminación entre Sacarosa y agua en roedores adiestrados en discriminar entre un 5% y un 10% de Sacarosa en un procedimiento operante (O'Hare *et al.*, 1997). Igual sucede en seres humanos en los cuales se ha observado que la Naltrexona no parece afectar a la discriminación entre Sacarosa y un placebo oral (Arbisi *et al.*, 1999).

### **B) Potencial acción post-ingestiva de los antagonistas opiáceos.**

Aunque muchos de estos estudios parecen implicar al Sistema Opiáceo con los procesos de recompensa y estarían a favor de una concepción de los antagonistas opiáceos como supresores de la respuesta hedónica inducida por las soluciones gustativas dulces, existen propuestas alternativas que relacionan al Sistema Opiáceo con los procesos post-ingestivos propios de la Saciación (Kirkham y Blundell, 1984, 1986; Glass *et al.*, 1999b, 2000). Estas propuestas consideran que la disminución de la

ingesta producida por los antagonistas opiáceos no sería más que el resultado de una interrupción normal de la regulación de la ingesta en el control energético hipotalámico del consumo de comida (Cota *et al.*, 2006).

Lugar destacado en este proceso lo desempeñarían las regiones hipotalámicas implicadas en la regulación de la homeostasis energética y que derivan de estudios llevados a cabo en las décadas de los 40 y 50 (Cota *et al.*, 2006).

Los opiáceos, según este último punto de vista, estarían implicados en el mantenimiento de la ingesta, incrementando la duración de la misma (Cota *et al.*, 2006). Se ha observado que la Naloxona no logra afectar la ingesta en su inicio pero acelera, sin embargo, el desarrollo de la Saciación (Kirkham y Blundell, 1984; Beczkowska *et al.*, 1992, 1993), suprimiendo la ingesta sobre todo en periodos de prueba de ingesta que superan los 10 minutos (Kirkham y Cooper, 1988a, b; Parker *et al.*, 1992; Schwarz-Stevens *et al.*, 1992; Ferraro *et al.*, 2002; Frisina y Sclafani, 2002). Estos resultados resultan contradictorios con la hipótesis de una disminución de las propiedades hedónicas ya que, en este último caso, si la Naloxona convierte teóricamente una sustancia apetitiva en “neutra”, debería ejercer su efecto, reduciendo el consumo, desde el principio de la prueba de ingesta.

En cualquier caso, la relevancia del Sistema Opiáceo en el mantenimiento de la ingesta ha sido confirmada por otros estudios en los cuales la administración de Naloxona disminuye la ingesta nutritiva sólo después de que los animales hayan consumido una sustancial cantidad de comida (Kirkham y Blundell, 1986; Glass *et al.*, 1999a).

Así pues, esta hipótesis implica a los opiáceos en el procesamiento post-ingestivo y considera que la Naloxona altera específicamente el mantenimiento de la ingesta haciendo que los animales alcancen el proceso de Saciación más tempranamente. Esta implicación de los opiáceos en la alimentación estaría relacionada más con las necesidades energéticas que con los aspectos recompensantes propios de la comida (Ferraro *et al.*, 2002; Frisina y Sclafani, 2002).

En resumen, la revisión bibliográfica presentada hasta ahora sugiere que las sustancias opiáceas desempeñarían una importante función en la ingesta, probablemente por la potenciación del valor hedónico de los nutrientes y/o por reducir la sensación de malestar producida por el desequilibrio homeostático (Le Magnen, 1992), aunque algunos autores entienden que el valor hedónico de la



comida se vería incrementado cuando éste es asociado con la eliminación del desequilibrio homeostático (Le Magnen, 1992).

### **C) Relevancia de los antagonistas opiáceos en los procesos de aprendizaje y memoria.**

Finalmente, existe un estudio que parece demostrar que los antagonistas opiáceos bloquean la adquisición o expresión de preferencias por la dieta (Levine *et al.*, 2002). Sin embargo, en una serie de experimentos llevados a cabo por Bodnar y Sclafani se ha demostrado que el bloqueo opiáceo no impide el desarrollo de preferencias gustativas hacia estímulos apetitivos. De hecho, se ha observado que si bien la Naltrexona disminuye la ingesta de un sabor asociado con Sacarosa no afecta a la adquisición ni a la expresión de la preferencia (Yu *et al.*, 1999; Azzara *et al.*, 2000; Frisina y Sclafani, 2002; Baker *et al.*, 2004). Más aún, utilizando como procedimiento el Condicionamiento de Preferencia hacia un Lugar (CPL), se observa que la Naltrexona inhibe la expresión pero no la adquisición del lugar preferido asociado con Sacarosa (Delameter *et al.*, 2000).

### **1.2.2.2. Sustrato Anatómico implicado en la acción del Sistema Opiáceo sobre la Ingesta.**

El efecto de los ligandos opiáceos sobre la conducta alimenticia no sólo depende de los distintos receptores opiáceos a los que se acoplan (Law y Loh, 1999), sino también del lugar anatómico donde se administran (Glass *et al.*, 2000; Cota *et al.*, 2006). Estos distintos efectos sobre la ingesta han sido mostrados tras la administración de agonistas y antagonistas opiáceos, tanto periféricamente como en diversas estructuras cerebrales relacionadas con este comportamiento consumatorio, incluyendo el Núcleo del Tracto Solitario (NTS) (Kotz *et al.*, 1995, 1997), el Complejo Parabraquial (PB) (Carr *et al.*, 1991; Moufid-Bellancourt y Velley, 1994; Wolinsky *et al.*, 1996; Nicklous y Simansky, 2003; Wilson *et al.*, 2003), el Núcleo Central de la Amígdala (CeA) (Giraudó *et al.*, 1998; Glass *et al.*, 2000; Levine *et al.*, 2004), Núcleos Hipotalámicos (Gulati y Ray, 1995; Kotz *et al.*, 1995; Stratford *et al.*, 1997; Glass *et al.*, 2000; Levine y Billington, 2004), el Área Tegmental Ventral (ATV) (Noel y Wise, 1995; Lamonte *et al.*, 2002; McDonald *et al.*, 2003) y la Cápsula (*Shell*) del Núcleo Accumbens (AccS) (Zang *et al.*, 1998; Zang y Kelley, 2002; Kelley *et al.*, 2002; Will *et al.*, 2003), entre otros.

### **1.2.2.2.1. Implicación del Complejo Parabraquial en la acción del Sistema Opiáceo sobre la Ingesta.**

El Complejo Parabraquial es una estructura troncoencefálica que está densamente inervada por vías extrínsecas procedentes de diversas estructuras (por ejemplo, Nervio Vago, NTS, Amígdala, Hipotálamo, etc.) y neuronas intrínsecas que sintetizan neuropéptidos opiáceos (Finley *et al.*, 1981; Fallon y Leslie, 1986; Standaert *et al.*, 1986; Moga *et al.*, 1990; Riche *et al.*, 1990; Nomura *et al.*, 1996; Gutstein *et al.*, 1998; Chamberlin *et al.*, 1999). Concretamente, en el PBl se han identificado una alta densidad de receptores opiáceos  $\mu$ ,  $\delta$  y  $k$  (Atweh y Kuhar, 1977; Lynch *et al.*, 1985; Sales *et al.*, 1985; Mansour *et al.*, 1988, 1995b; Ding *et al.*, 1996; Chamberlin *et al.*, 1999), aunque la mayor concentración de receptores  $\mu$  se localiza en los núcleos PBle, PBl central y PBm. Por su parte, los receptores del tipo  $\delta$  y  $k$  han sido localizados tanto en la zona PBl dorsal como en PBl ventral (Lynch *et al.*, 1985; Mansour *et al.*, 1988, 1995b; Ding *et al.*, 1996).

A partir de este hecho, se ha propuesto que el PBl podría estar implicado en los efectos opiáceos sobre la ingesta y, así, la administración de agonistas opiáceos en esta región incrementa la ingesta de comida, un efecto hiperfágico que puede ser bloqueado mediante la administración de antagonistas opiáceos (Wilson *et al.*, 2003). Más aún, la administración de antagonistas opiáceos en el PBl disminuye la alimentación inducida por privación de comida (Wilson *et al.*, 2003), además de aumentar el umbral de la Estimulación Eléctrica del Hipotálamo Lateral inductora de ingesta (Carr *et al.*, 1991).

Más aún, se ha observado que en el PBl se produce una regulación a la baja en el número de receptores opiáceos  $\mu$  tras la restricción crónica de comida (Wolinsky *et al.*, 1996), lo cual indica que el estado fisiológico de los animales influye de alguna manera sobre la ingesta inducida por los opiáceos dentro de esta área pontina (Wolinsky *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 2003).

Dentro del Área Parabraquial Lateral, el PBle ha sido considerado como parte de alguno de los sistemas de recompensa cerebral (Simón *et al.*, 2007), observándose Condicionamiento de Preferencia hacia un Lugar (CPL) asociado a su Estimulación Eléctrica, efecto recompensante que es bloqueado mediante la administración subcutánea de Naloxona (Simón *et al.*, 2007). Esta idea es compatible con ciertas observaciones en las que la administración intragástrica tanto de nutrientes (por ejemplo, Lactosa, Sacarosa, Glucosa, Maltosa o Policosa) (Wang *et al.*, 1999;

Yamamoto y Sawa, 2000a) como de sustancias apetitivas (por ejemplo, Sacarina) (Yamamoto y Sawa, 1994, 2000b) induce expresión *c-fos* en el PBle, entre otros núcleos cerebrales. Por el contrario, las lesiones del Área Parabraquial (que incluirían presumiblemente el PBle) eliminó la preferencia por comida apetitiva (Edwards y Ritter, 1989). Más específicamente, las lesiones del PBle bloquean la preferencia por los estímulos gusto-olfatorios asociados con la administración intragástrica de nutrientes reforzantes pre-digeridos (Zafra *et al.*, 2002).

Se ha propuesto que la implicación del Área Parabraquial en los procesos recompensantes podría estar relacionada con una modificación específica en el valor hedónico de los estímulos gustativos (Berridge, 2003). De hecho, en el área PBI se han identificado neuronas sensibles a las propiedades motivacionales y oro-sensoriales de los estímulos gustativos (Halsell y Frank, 1992; Yamamoto *et al.*, 1994; Halsell y Travers, 1997; Karimnamazi *et al.*, 2002; Sowards, 2004). Por el contrario, las lesiones globales del PBI (que pueden incluir al PBle) atenúan el comportamiento hiperfágico de estímulos gustativos apetitivos producidos por lesión del Área Postrema (Edwards y Ritter, 1989). Esto sugiere que el PBI podría constituir una importante estructura moduladora en el proceso de evaluación hedónica de ciertos estímulos gustativos “innatamente preferidos” (Simón *et al.*, 2007). En este sentido, fármacos como el Midazolam, que incrementa la ingesta al modificar al parecer su componente hedónico (Treit y Berridge, 1990; Berridge y Pecina, 1995), actuaría específicamente sobre el Área Parabraquial Lateral (Söderpalm y Berridge, 2000).

En relación con la posibilidad de que los receptores opiáceos  $\mu$  y  $\kappa$ , identificados en el PBI, puedan estar implicados en algunos de los efectos relacionados con la modificación del valor hedónico de los estímulos gustativos (Carr *et al.*, 1991; Moufid-Bellancourt *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 2003), conviene recordar, al respecto, las sugerencias de diversos autores que consideran que las diferentes modalidades recompensantes (homeostasis, sustancias de abuso, estimulación eléctrica, etc.) podrían implicar un sustrato neurobiológico común (Berman *et al.*, 1994; Wolinsky *et al.*, 1996; Fernández-Espejo, 2002; Kelley y Berridge, 2002).

Por otro lado, las abundantes conexiones Parabraquiales con el Hipotálamo (Fulwiler y Saper, 1984; Moga *et al.*, 1990; Halsell, 1992; Krukoff *et al.*, 1994), ofrecen la posibilidad de que esta región pontina pueda desempeñar una función moduladora sobre la actividad neural hipotalámica en relación con la ingesta normal. En este sentido, se han identificado fibras que, por ejemplo, se originan en la zona lateral del

PBl dorsal (PBld) y finalizan en el Hipotálamo Ventromedial utilizando Colecistoquinina (CCK), un neurotransmisor implicado en nutrición (Inagaki *et al.*, 1984). También dentro de la región parabraquial, y en concreto en los subnúcleos laterales superior (PBls) y PBle, existen regiones en las cuales actuaría la Leptina, una hormona que ha sido implicada repetidamente en regulación de la ingesta y el peso corporal (Elmqvist *et al.*, 1997, 1998; Ahima *et al.*, 2000; Elias *et al.*, 2000), aunque también en otras funciones relacionadas con ella como, por ejemplo, en la modulación del circuito de refuerzo en relación con la conducta nutritiva (Ahima y Flier, 2000).

En resumen, parece probable que el circuito neuronal relacionado con la ingesta nutritiva localizado principalmente en el Hipotálamo, incluya conexiones recíprocas con estructuras troncoencefálicas (por ejemplo, NTS o PB) (Kalra *et al.*, 1999; Grill y Kaplan, 2002; Seeley y Woods, 2003; Flier, 2004). En este sentido, existe la posibilidad de que el Área Parabraquial participe en los procesos recompensantes y particularmente en la modificación específica del valor hedónico de los estímulos gustativos, así como en la reducción de los estados de necesidad (Le Magnen, 1992; Berridge, 2003; Simón *et al.*, 2007).

#### **1.2.2.2. Implicación del Núcleo Central de la Amígdala en la acción del Sistema Opiáceo sobre la Ingesta.**

El CeA ha sido asociado con la integración de las señales gustativas, hedónicas y autonómicas relacionadas con la ingesta de alimentos (Pomoni *et al.*, 2000), así como en los efectos del Sistema Opiáceo sobre esta conducta regulatoria (Li y Rowland, 1993; Giraud *et al.*, 1998; Swanson y Petrovich, 1998; Glass *et al.*, 2000). Concretamente, se ha observado que la administración de agonistas opiáceos (DAMGO) en el subnúcleo CeA aumenta el volumen de la ingesta de comida, efecto que es bloqueado con la administración previa de un antagonista opiáceo (Naloxona) (Giraud *et al.*, 1998). Por otra parte, la administración de antagonistas opiáceos en el CeA disminuye la ingesta cuando se trata de comida preferida (Glass *et al.*, 2000). Estos resultados apoyan la idea de que la preferencia por una dieta requieren la participación de vías opiáceas localizadas en algunas estructuras límbicas, entre ellas, el CeA (Glass *et al.*, 2000). Además, sugieren que este subnúcleo amigdalino podría actuar como mediador entre los sistemas sensoriales/afectivos del prosencéfalo y el circuito alimenticio hipotalámico (Swanson y Petrovich, 1998; Glass *et al.*, 2000). En otras palabras, el CeA podría modular la actividad hipotalámica asociando los procesos sensoriales a un estado metabólico (Glass *et al.*, 2000).

Asimismo, se ha observado que la administración periférica de Naloxona o Naltrexona induce expresión *c-fos* en el CeA (Pomonis *et al.*, 1997, 2000; Carr *et al.*, 1998; Gestreau *et al.*, 2000; Georges *et al.*, 2000; Hamlin *et al.*, 2001, 2004; Le Guen *et al.*, 2001; Veinante *et al.*, 2003).

Por último, el CeA ha sido implicado en la liberación de los opiáceos endógenos inducidos a través del consumo de comidas recompensantes (por ejemplo, Sacarosa), produciéndose en este subnúcleo un aumento en la expresión *c-fos* inducida por la Naloxona (Pomonis *et al.*, 2000).

## **2. APRENDIZAJE DE DISCRIMINACIÓN GUSTATIVA.**

La evolución ha dotado a los animales con capacidad para establecer preferencias y aversiones inherentes hacia ciertos sabores que suelen estar relacionados con importantes consecuencias post-ingestivas (Reilly y Bornovalova, 2005). Sin embargo, los animales también están equipados con mecanismos de aprendizaje que permiten que su ingesta puede ser modificada por la experiencia. Uno de esos mecanismos de aprendizaje adaptativo es el denominado Aprendizaje Interoceptivo Gustativo (Reilly y Bornovalova, 2005).

Estudios previos llevados a cabo en este laboratorio han identificado dos sistemas neuroanatómicos diferentes con respecto a este proceso adquisitivo, aversivo o recompensante, que han sido denominados Concurrente (Implícito) y Secuencial (Explícito) (Arnedo *et al.*, 1990; 1993; Gallo *et al.*, 1990; 1991; Agüero *et al.*, 1993a; 1993b; 1997; Cubero *et al.*, 2001; Mediavilla *et al.*, 1999, 2000, 2001, 2005).

### **2.1. APRENDIZAJE AVERSIVO GUSTATIVO: CARACTERÍSTICAS.**

El Aprendizaje Aversivo Gustativo (AAvG) más habitual (Secuencial), fue descubierto por J. Garcia en 1955 (Garcia *et al.*, 1955) y consiste en la predisposición biológica de los animales para asociar un alimento o un sabor con sus consecuencias nocivas, generalmente de origen visceral (Garcia *et al.*, 1955; Lamprecht y Dudai, 2000). Esta modalidad de aprendizaje universal es potente y duradera, de modo que basta una sola experiencia para que el sujeto evite en el futuro la ingesta de todo alimento que tenga las mismas características gusto-olfatorias.

Se trata de un mecanismo de protección ante estímulos potencialmente peligrosos para su supervivencia y ello puede explicar que esté presente en casi todas

las especies animales conocidas (Wilcoxon *et al.*, 1971; Gustavson *et al.*, 1976; Terk y Green, 1980; Cannon *et al.*, 1983; Garcia *et al.*, 1985; Martin y Lett, 1985; Fox *et al.*, 1990; Houtp *et al.*, 1990; Terrick *et al.*, 1995; Paradis y Cabanac, 2004). Una excepción a esta regla general son los murciélagos vampiros, que toman sangre de otros animales (Ratcliffe *et al.*, 2003).

Procedimentalmente, el AAvG es inducido mediante la exposición a un sabor, en uno o más ensayos de aprendizaje y con demora variable, seguido de la administración central o periférica de un producto nocivo que suele ocasionar malestar visceral, náuseas y/o vómitos en el sujeto (Molina y Puerto, 1981). Por sus características, el AAvG está considerado como un modelo peculiar del aprendizaje y la memoria (Molina y Puerto, 1981).

Los estímulos nocivos utilizados son de muy diversa índole: Cloruro de Sodio (NaCl) hipertónico (Arnedo *et al.*, 1990, 1991; Arnedo *et al.*, 1993; Mediavilla *et al.*, 2000, 2001, 2005), Anfetaminas (Shukitt-Hale *et al.*, 2000; Rabin *et al.*, 2002), Metilnitrato de Escopolamina (Gallo *et al.*, 1988), Cloruro de Litio (LiCl) (Ritter *et al.*, 1980; Rabin y Hunt, 1983; Bermudez-Rattoni *et al.*, 1987; Agüero *et al.*, 1993b; Morris *et al.*, 1999; Yasoshima *et al.*, 2000; Rollins *et al.*, 2001), Ácido Clorhídrico (HCl) (Ervin *et al.*, 1990), Aminoácidos (Nakashima *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003), Sulfatos (Coil y Norgren, 1981; Houtp *et al.*, 1996), Apomorfina (McAllister y Pratt, 1998; Van der Kooy *et al.*, 1983), Alcohol (Kiefer y Morrow, 1991; Thiele *et al.*, 1996; Cubero *et al.*, 2001), Cocaína (Aja *et al.*, 2002; Grakalic y Riley, 2002) entre otros. Pero también manipulaciones tales como la administración de radiaciones (Garcia *et al.*, 1955; Ossenkopp, 1983; Rabin *et al.*, 2000; Shobi y Goel, 2001), rotación corporal (Gallo y Puerto, 1986) o, incluso, la administración de sustancias no tóxicas de carácter nutritivo (Deutsch *et al.*, 1976). En cualquier caso, todos ellos producen una respuesta característica: la evitación del sabor.

En el caso de los seres humanos, el AAvG no sólo influye sobre la selección de los alimentos (Bernstein, 1999; Garb y Stunkard, 1974; Midkiff y Bernstein, 1985), sino que afectan a ciertos grupos clínicos (por ejemplo, pacientes con cáncer bajo quimio/radioterapia y pacientes con Anorexia Nerviosa) muy propensos a las consecuencias adversas de esta experiencia (Woods, 1991; 2004; Woods *et al.*, 2000), a veces tan severas que hace que algunos pacientes renuncien al tratamiento a pesar de las obvias consecuencias para su supervivencia (Boakes *et al.*, 1993).

Esta modalidad de aprendizaje (entre otras) supuso un replanteamiento de las leyes generales y universales del Condicionamiento Clásico (C.C.) que hasta ese momento regían en la teoría del aprendizaje. Su diferenciación cualitativa con respecto al C.C. motivó la introducción de la perspectiva evolutiva y neuroetológica en la explicación del fenómeno, en particular, y del aprendizaje, en general (García *et al.*, 1985).

En efecto, el AAvG posee, al menos, tres características esenciales que la definen y diferencian de las leyes generales y universales del C.C., como son la rapidez de adquisición y resistencia a la extinción; larga demora inter-estimular; y especificidad estimular. Existen, sin embargo, propuestas teóricas que todavía pretenden encuadrar al AAvG dentro del modelo del C.C. y sus leyes generales (Bitterman, 1975; Shaw, 1988; Davidson, 1993).

A pesar de este esfuerzo, las peculiares características del AAvG sólo han podido ser parcialmente reproducidas en modelos de C.C., pero nunca todas ellas de manera simultánea, sino de forma parcial y aislada (Cannon *et al.*, 1985).

## **2.2. MECANISMOS CEREBRALES IMPLICADOS EN LA ADQUISICIÓN DEL APRENDIZAJE AVERSIVO GUSTATIVO.**

Al igual que en cualquier otra manifestación comportamental conocida, no existe un único “centro” del AAvG, sino que a lo largo de la evolución se han desarrollado complejos circuitos interconectados que constituyen la base neuroanatómica y funcional del AAvG. Estas unidades están, posiblemente, especializadas en el procesamiento de aspectos concretos de este aprendizaje, distribuyendo sus funciones a través de organizaciones paralelas y jerárquicas (Mediavilla *et al.*, 2001).

Una breve revisión de los conocimientos disponibles en relación a estos circuitos del AAvG se expone en los párrafos siguientes.

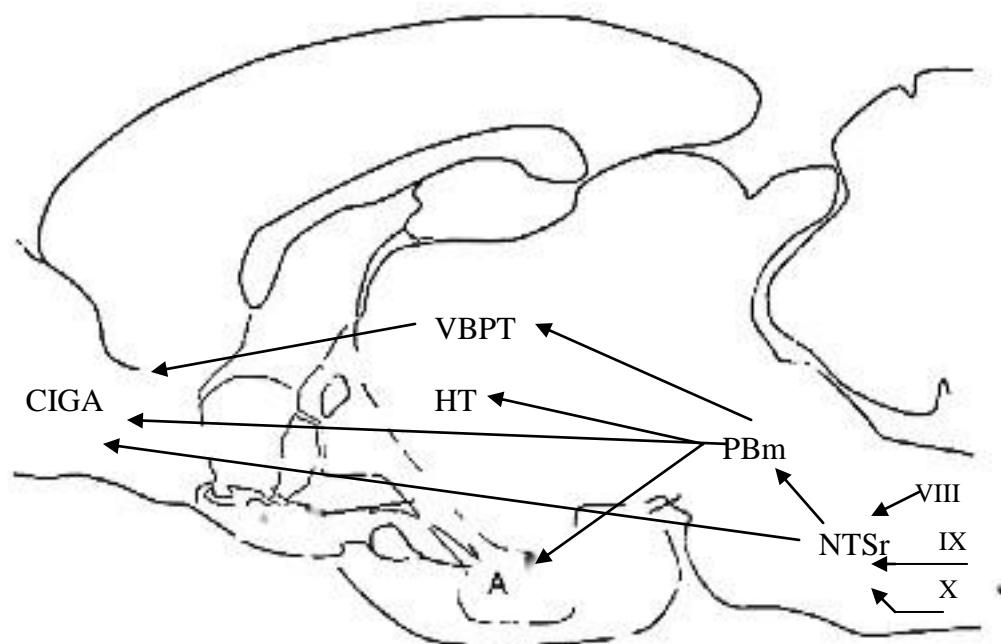
### **2.2.1. TRANSMISIÓN DE LA INFORMACIÓN GUSTATIVA AL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.**

Aunque tradicionalmente el Sistema Gustativo ha sido considerado como una modalidad sensorial especial (Brodal, 1981), nadie duda en considerarlo también como una modalidad interoceptiva (Lamprecht y Dudai, 2000), funcionalmente paralela aunque independiente del procesamiento visceral.

Los estudios anatómo-fisiológicos consideran que los quimio-receptores gustativos más anteriores, situados en la lengua, estarían implicados en el procesamiento de los aspectos de la “palatabilidad” de los estímulos nutritivos (Novin *et al.*, 1981; Breslin *et al.*, 1992), en la selección de la dieta (Finger y Morita, 1985) y en la regulación del balance energético hidromineral (citado en Cubero, Tesis Doctoral, 1995). Por su parte, los quimio-receptores gustativos posteriores, que incluso han sido localizados en el esófago o cercanos al tracto digestivo, se relacionan con la regulación y control de la ingesta en general y de defensas a través de, por ejemplo, la emesis (Finger y Morita, 1985).

Este sistema está asociado a los nervios craneales VII, IX y X (facial, glossofaríngeo y vago, respectivamente), cuyas aferencias convergen en células troncoencefálicas donde, además, las respuestas gustativas periféricas son magnificadas (Ogawa y Hayama, 1984).

En efecto, el primer relevo ocurre a nivel del Bulbo Raquídeo, en el Núcleo del Tracto Solitario (NTS) (Travers y Norgren, 1995; Travers y Hu, 2000). Posteriormente, a nivel pontino, las neuronas gustativas proyectan a la denominada Área Gustativa Pontina, la división medial del Complejo Parabraquial (PBm) (Norgren y Leonard, 1973) (Figura 0.6).



**Figura 0.6:** Transmisión de la información gustativa al SNC en una lámina sagital del cerebro de la ratona. A: Amígdala; CIGA: Corteza Insular Gustativa Anterior; HT: Hipotálamo; NTSr: Parte Rostral del Núcleo del Tracto Solitario; PBm: Núcleo Parabraquial Medial; VBPT: Complejo Ventrobasal Posterior; VIII: Nervio Facial; IX: Nervio Glossofaríngeo; X: Nervio Vago.



A partir del TC la información del Sistema Gustativo proyecta hacia diversas estructuras diencefálicas y corticales, particularmente al Complejo Ventrobasal Posterior Talámico (VBPT) (Finger y Morita, 1985; Cechetto y Saper, 1987), hacia la Sustancia Innomiada (Norgren, 1974), el Hipotálamo (HT) (Norgren, 1976), la Amígdala (A) (Fulwiler y Saper, 1984; Lasiter y Glanzman, 1985; Pascoe y Kapp, 1987) y hacia la capa granular de la Corteza Insular Gustativa Anterior (CIGA). Esta última zona cortical recibe sus aferencias de diversas áreas gustativas, a saber: a) una vía sin relevo sináptico secundario, procedente directamente del NTSr y, supuestamente, de procesamiento rápido (Shipley y Geinisman, 1984), b) una proyección eferente desde el PBm (Saper y Loewy, 1980; Fulwiler y Saper, 1984; Moga *et al.*, 1990) c) una vía polisináptica desde el VBPT (Cechetto y Saper, 1987) (Figura 0.6).

Este circuito se cierra con fibras eferentes que suponen controles recíprocos de retroalimentación centrífuga para la mayor parte de las estructuras encefálicas mencionadas (Fulwiler y Saper, 1984; Cechetto y Saper, 1987; Lundy y Norgren, 2001).

Los estudio conductuales realizados sobre esta temática sugieren que la percepción y detección sensorial gustativa se integra y organiza, al menos parcialmente, en niveles caudales encefálicos, concretamente en el TC. De hecho, animales descerebrados a nivel supra-colicular pueden discriminar los estímulos gustativos básicos, mostrando patrones conductuales de reactividad orofaríngea análogos a la de los sujetos neurológicamente intactos (Grill y Norgren, 1978) y regulando también aspectos parciales de la conducta nutritiva, al menos en lo que respecta a la elicitación de reflejos conductuales de aceptación y/o rechazo de alimentos con determinadas características gustativas (Steinert *et al.*, 1979; Mark *et al.*, 1988; Rilley *et al.*, 1993).

Sin embargo, aunque el TC muestra una capacidad indiscutible para cierto nivel de integración funcional, dicha regulación dista mucho de ser completa y los datos disponibles sugieren que los aspectos conductuales más complejos de aceptación y/o rechazo quedan siempre afectados en los animales descerebrados (Mark *et al.*, 1988).

Por lo tanto, de acuerdo con los estudios conductuales se puede concluir que si bien los sujetos descerebrados puedan regular ciertas conductas simples y reflejas, estos animales se muestran incapaces de controlar respuestas más complejas, tales

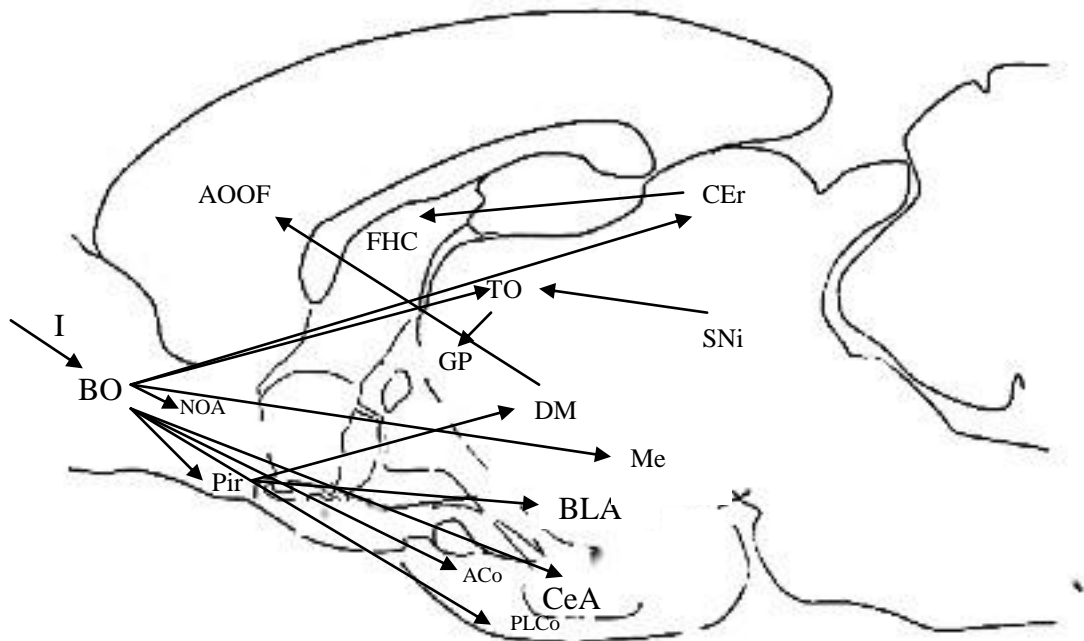
como la adquisición y el aprendizaje de asociaciones específicas a dichos estímulos gustativos (Grill y Norgren, 1978; Mark *et al.*, 1988).

### **2.2.2. TRANSMISIÓN DE LA INFORMACIÓN OLFATORIA AL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.**

El sentido del olfato es una modalidad sensorial que es procesada en sus primeras etapas por el I Par Craneal (Price, 1990) y que, peculiarmente, alcanza la corteza cerebral sin pasar previamente por el Tálamo.

La información olfatoria es procesada en un primer momento por neuronas olfatorias bipolares que se encuentran en la mucosa olfatoria situada en el Epitelio Olfatorio, en la parte posterodorsal de la cavidad nasal (Nakashima *et al.*, 1984; Price, 1990). La porción periférica de estas neuronas olfatorias primarias receptoras es quimio-sensible y la parte central se trata de un axón amielínico que proyecta directamente hacia el SNC (el conjunto de estos axones formaría el Nervio Olfatorio o Nervio Craneal I).

El primer relevo de la información olfatoria en el SNC es el Bulbo Olfatorio (BO) que proyecta a través del Tracto Olfatorio directamente a su relevo secundario, la Corteza Olfatoria Primaria (COP), que no es una única zona, sino más bien 5 regiones estructurales diferentes situadas en la superficie ventral y medial del hemisferio cerebral. Estas 5 regiones son el Núcleo Olfatorio Anterior (NOA), la Amígdala, el Tubérculo Olfatorio (TO), la Corteza Piriforme (Pir) y la Corteza Entorrinal Rostral (CEr) (Figura 0.7), cada una de las cuales se encargaría del procesamiento de los distintos aspectos de la información olfatoria (Price, 1990; Martin, 1997) (Figura 0.7).



**Figura 0.7:** Procesamiento de la información olfatoria al SNC en una lámina sagital del cerebro de la rata. ACo: núcleo cortical anterior de la amígdala; AOOF: área olfatoria orbito-frontal; BO: bulbo olfatorio; BL: núcleo basolateral de la amígdala; CeA: núcleo central de la amígdala; CEr: corteza entorrinal; DM: núcleo dorsomedial del tálamo; FHC: formación hipocámpica; GP: globo pálido; Me: núcleo medial de la amígdala; NOA: núcleo olfatorio anterior; Pir: corteza piriforme; PLCo: núcleo cortical posterolateral de la amígdala; SNi: sustancia negra; TO: tubérculo olfatorio.

Una gran variedad de estudios han mostrado conexiones directas entre el BO y la Amígdala, dirigidas concretamente hacia los Núcleos Amigdalinos Centromediales (Núcleo Corticales Anterior, Núcleo Cortical Posterolateral y Núcleo Medial) (Scalia y Winans, 1975; Price, 1990). El BO también envía una proyección directa hacia el Núcleo Amigdalino Central (CeA) (Ottersen, 1982) (Figura 0.7).

Existen conexiones indirectas entre el BO y la Amígdala, generalmente dirigidas hacia el Núcleo Basolateral de la Amígdala (BLA), vía Corteza Piriforme (Pir) (Powell *et al.*, 1965) (Figura 0.7). La Corteza Piriforme (Pir), además, proyecta directamente hacia el Núcleo Dorsomedial del Tálamo (DM), que a su vez proyecta hacia el Área Olfatoria de la Corteza Orbitofrontal (AOOF) (Figura 0.7).

### **2.2.3. TRANSMISIÓN DE LA INFORMACIÓN VISCERAL AL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.**

La transmisión de la información de origen visceral hacia el SNC es más compleja. Diferentes sistemas de detección periférica se ofrecen para detectar, procesar y transmitir los estímulos de origen visceral que posteriormente serán transmitidos hacia las diversas estructuras centrales.

Aunque la mayoría de estudios se han centrado en la investigación de los centros encefálicos relacionados con el aprendizaje viscerogustativo frente al estudio de los sistemas de transmisión (periféricos) de la información del estímulo visceral, existen datos experimentales que han puesto de manifiesto la relevancia funcional de los quimio-receptores vagales gastro-intestinales, por un lado (Arnedo y Puerto, 1986; Arnedo *et al.*, 1990, 1991; Arnedo *et al.*, 1993), y, por el otro, del sistema humoral y los centros quimio-receptores centrales asociados (Ladowsky y Ossenkopp, 1986; Gallo *et al.* 1988, 1990, 1991; Bernstein *et al.*, 1992).

### **2.2.3.1. Mecanismos de la Transmisión Visceral Vagal-Cerebral.**

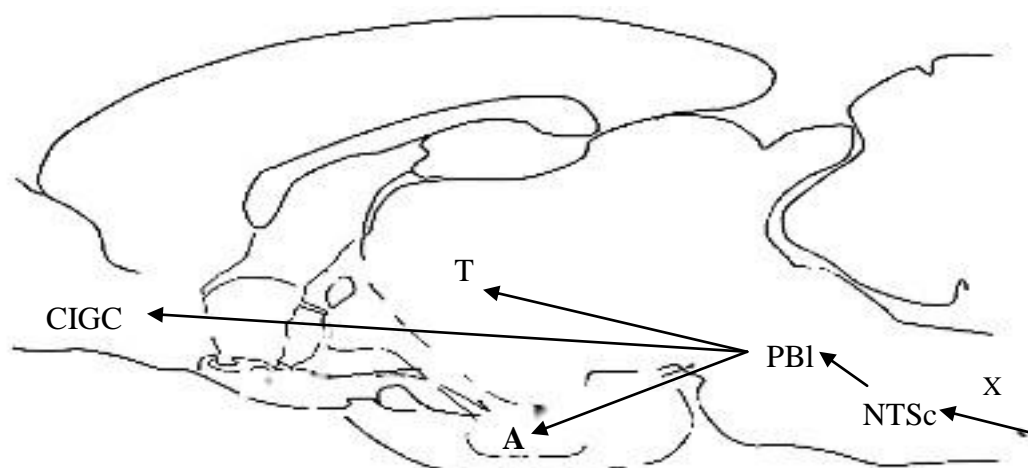
El Nervio Vago incluye una serie de sistemas anatómicos (aférentes en un 90%) que inervan, entre otros órganos corporales, el aparato digestivo. La información visceral es captada por una variedad de receptores vagales situados en la cavidad gastrointestinal y entre los cuales existen mecanorreceptores, quimiorreceptores, osmorreceptores o termorreceptores (Blackshaw y Grundy, 1989).

Este sistema dispone de mecanismos de detección y procesamiento rápido que pueden detectar la presencia de los distintos productos presentes en el sistema digestivo antes de ser absorbidos y de que ingresen en el torrente sanguíneo. Este mecanismo activa sistemas de defensa y protección tales como las respuestas eméticas, pero sólo en el caso de algunas sustancias (no todas) que puedan ser fisiológicamente adecuadas a estos sistemas sensoriales.

Anatómicamente la vía vagal tiene su primera conexión en el área caudal del Núcleo del Tracto Solitario (NTSc) (Contreras *et al.*, 1980; Norgren y Smith, 1988; Hyde y Miselis, 1982), mientras que su siguiente relevo se sitúa ya en el Complejo Parabraquial, con neuronas que, por ejemplo, se activan en respuesta a la administración de NaCl hipertónico en el Sistema Porta-Hepático (Krivanec, 1993; Herman y Rogers, 1985; Adachi y Kobashi, 1985): NaCl hipertónico administrado intragástricamente (Kobashi *et al.*, 1993; Yamamoto, 1993; Yamamoto y Sawa, 2000a; Michl *et al.*, 2001) y subcutáneamente (Rinaman *et al.*, 1997); LiCl administrado intraperitonealmente (Yamamoto *et al.*, 1992; Gu *et al.*, 1993; Navarro *et al.*, 2000), subcutáneamente (Hamamura *et al.*, 1999) e intragástricamente (Yamamoto y Sawa, 2000a); Ácido Clorhídrico (HCl) administrado intragástricamente (Yamamoto y Sawa, 2000a; Michl *et al.*, 2001); Etanol administrado intraperitonealmente (Thiele *et al.*, 2000) e intragástricamente (Yamamoto y Sawa, 2000a); Lactosa administrada

intragástricamente (Yamamoto y Sawa, 2000a); Sacarosa administrada intraoral e intragástricamente (Yamamoto y Sawa, 2000b); Gastrina administrada intravenosamente (Yakabi *et al.*, 2002); entre otros.

Esta vía vagal-pontina proyecta al Tálamo (Yamamoto *et al.*, 1992), la Amígdala (Saper y Lowey, 1980; Moga *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1993) y, posteriormente, hacia la porción caudal de la Corteza Insular (CIGC) (Ito, 1992, 1994) (Figura 0.8).



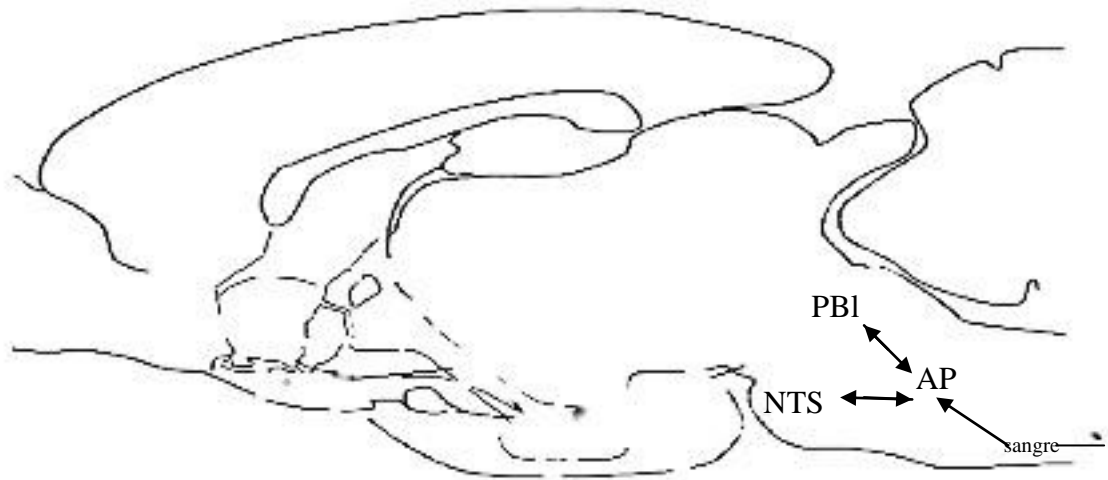
**Figura 0.8:** Procesamiento de la información visceral vagal al SNC en una lámina sagital del cerebro de la rata. A: Amígdala; CIGC: Corteza Insular Gustativa Caudal; NTSc: Parte Caudal del Núcleo del Tracto Solitario; PBl: Núcleo Parabraquial Lateral; T: Tálamo; X: Nervio Vago.

### **2.2.3.2. Mecanismos Humorales/Circulatorios de la Transmisión Visceral.**

La otra vía de acceso al SNC de los estímulos de origen visceral entra en funcionamiento después del proceso de absorción e ingreso en la sangre, para acceder así a centros encefálicos específicos relacionados con el sistema sensorial humoral visceral. Este procesamiento supone una lentitud considerable sobre todo si se compara con las vías de transmisión nerviosa.

Las sustancias que ingresan en el torrente sanguíneo, pero que no atraviesan la Barrera Hemato-Encefálica (BHE), pueden ser detectadas por estructuras cerebrales especializadas, órganos circunsventriculares, que al carecer de ella detectan la información y la trasladan a centros de rango superior capaces de activar reflejos de defensa y protección, así como de elicitar respuestas integradas y adaptativas (Chambers, 1990).

El principal centro detector de la vía humoral en el SNC es el Área Postrema (AP) (Gallo *et al.*, 1988, 1990, 1991; Yamamoto *et al.*, 1992; Bernstein *et al.*, 1992), situada en la base del IV ventrículo, en el Bulbo Raquídeo, y que actúa, en la mayoría de los mamíferos, como centro emético (Adachi y Kobashi, 1985; Kobashi *et al.*, 1993). Este núcleo mantiene conexiones recíprocas con estructuras tales como el NTS y el PB (Cunnigham *et al.*, 1994). El PB es el principal centro de proyección de las vías eferentes del AP, pero sobre todo el área lateral (PBI) (Yamamoto *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1993) (Figura 0.9).



**Figura 0.9:** Procesamiento de la información visceral humoral al SNC en una lámina sagital del cerebro de la rata. AP: Área Postrema; NTS: Núcleo del Tracto Solitario; PBI: Núcleo Parabraquial lateral.

Aunque con respecto al AAvG los resultados obtenidos revelan la importancia del AP en tareas de aprendizaje Secuencial, existe el convencimiento de que no puede ser considerada como el lugar de retención de las asociaciones viscerogustativas (Ladowsky y Ossenkopp, 1986; Gallo *et al.*, 1988, 1990, 1991; Bernstein *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1992).

#### **2.2.4. LAS ZONAS DE CONVERGENCIA VISCERO-GUSTO/OLFATORIA COMO POTENCIAL BASE ANATÓMICA DEL APRENDIZAJE AVERSIVO GUSTATIVO.**

Aunque los sistemas neurales del AAvG no han sido determinados con precisión, resulta probable que las zonas críticas en este proceso comportamental sean aquellas donde se producen la convergencia de la información visceral y la gustativa u olfatoria (García *et al.*, 1968; Yamamoto *et al.*, 1991; Yamamoto, 1993; Bures *et al.*, 1998).

Así, se han propuesto varias regiones donde pudiera producirse esta convergencia anatómica (Fulwiler y Saper, 1984; Shipley y Geinisman, 1984; Cechetto y Saper, 1987) y en la que existen células doblemente sensibles a estímulos gustativos y a estímulos viscerales, y entre ellas el NTS y el PB (Norgren y Leonard, 1973; Norgren, 1976; Travers *et al.*, 1986; Kobashi y Adachi, 1986; Yamamoto *et al.*, 1992).

A su vez, estos centros de información gustativa y visceral proyectan hacia centros encefálicos más rostrales, especialmente hacia la Amígdala y la Corteza Insular (Saper y Lowey, 1980; Moga *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1992) (Figura 0.3).

#### **2.2.4.1 Los dos Sistemas Neurobiológicos de Transmisión Visceral (Vagal y Humoral) sustentan dos Modalidades de AAvG (Concurrente y Secuencial).**

Se ha considerado que las características funcionales de los dos sistemas neurobiológicos responsables del procesamiento de información visceral podrían constituir el sustrato biológico inicial de las dos modalidades de AAvG, Concurrente y Secuencial (García *et al.*, 1985; Kiefer, 1985; Chambers, 1990; García, 1990; Mediavilla *et al.*, 2001, 2005).

La implicación y relevancia de uno u otro sistema neurobiológico estaría en función de factores tales como el tipo de agente visceral utilizado, la vía de administración del mismo, el tipo de procedimiento experimental utilizado y el intervalo inter-estimular (Chambers, 1990; Arnedo *et al.*, 1990, 1991; Gallo *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1992; Agüero *et al.*, 1993a, b; Agüero *et al.*, 1997; Mediavilla *et al.*, 1998, 1999, 2001, 2005).

En el procedimiento del AAvG Concurrente deben activarse los mecanismos neurales de detección visceral vagal, de modo que el organismo pueda conocer, rápidamente, las características químicas de los alimentos que consume y, gracias a esta capacidad de detección, puede discriminar y reaccionar inmediatamente acerca de la conducta de ingesta o al comportamiento de rechazo más adecuado en cada momento.

El procedimiento experimental que se sigue en el AAvG Concurrente consiste en la presentación al mismo tiempo de dos estímulos gusto-olfatorios, durante todos los ensayos de adquisición, aunque sólo uno de ellos es asociado con la administración intragástrica simultánea de un estímulo nocivo, mientras que el otro estímulo gusto-olfatorio es asociado con la administración de Suero Fisiológico (Fotografía 1.1).

En efecto, este proceso parece implicar al Nervio Vago, ya que las Vagotomías o las axotomías del sistema aferente vagal bloquean el AAvG inducido tanto con NaCl hipertónico (Arnedo y Puerto, 1986; Arnedo *et al.*, 1989, 1990, 1991; Arnedo *et al.*, 1993) como con morfina administrada vía intraperitoneal (Bechara *et al.*, 1993).

Por su parte, el procedimiento experimental del AAvG Secuencial supone la presentación cada día de uno u otro de los dos estímulos gusto-olfatorios, uno de los cuales (con demora inter-estimular) va seguido de la administración del estímulo nocivo visceral. Así, una característica peculiar de esta modalidad de aprendizaje es que puede llevarse a cabo sin el requisito de contigüidad inter-estimular, puede ser adquirido en un solo ensayo, es flexible y sensorialmente específico (Gallo *et al.*, 1990, 1991; Gallo *et al.*, 1998; Mediavilla *et al.*, 2001)

En este último caso las Vagotomías no interrumpen la adquisición de AAvG Secuencial cuando se utiliza sulfato de cobre administrado intravenosamente (Coil *et al.*, 1978), alcohol, tanto intragástrica como intraperitonealmente (Kiefer *et al.*, 1980), LiCl (Martin *et al.*, 1978; Arnedo *et al.*, 1991) o radiaciones que ocasionan malestar visceral (Hunt *et al.*, 1987).

Esta ausencia de efecto de las Vagotomías sobre la adquisición de AAvG Secuencial sugiere que los estímulos siguen rutas alternativas a la del Nervio Vago, y así estructuras implicadas en el procesamiento visceral humoral como, por ejemplo, el Área Postrema, al ser dañadas interrumpen la adquisición de AAvG Secuencial (Ladowsky y Ossenkopp, 1986; Gallo *et al.*, 1988, 1990, 1991; Bernstein *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1992).

Estas dos modalidades han sido consideradas como procesos adquisitivos diferentes, o diferentes modalidades de aprendizaje, aunque el resultado final, en ambos casos, sea evitar uno de los estímulos gusto-olfatorios. En este sentido, existen datos que sugieren que las características distintivas del AAvG Concurrente (por ejemplo, aprendizaje incremental, contigüidad estimular, rigidez, etc.) podrían incluirse dentro de las modalidades de Memoria Procedimental/Implícita, mientras que los rasgos del AAvG Secuencial (por ejemplo, un solo ensayo, demora entre el estímulo gusto-olfatorio y el estímulo aversivo-visceral, flexibilidad, etc.) parecen similares a las modalidades Declarativo/Relacional/Explícita (Mediavilla *et al.*, 2001).



## **2.3. ESTRUCTURAS CEREBRALES IMPLICADAS EN EL APRENDIZAJE AVERSIVO GUSTATIVO.**

### **2.3.1. IMPLICACIÓN FUNCIONAL DEL COMPLEJO PARABRAQUIAL.**

En general, las lesiones globales de la región Parabraquial interrumpen tanto el Aprendizaje Aversivo Gustativo (AAvG) como el Olfatorio (AAvO) inducido con LiCl (Reilly *et al.*, 1993).

Más específicamente, se ha demostrado que las lesiones del PBm interrumpe la adquisición del AAvg en su modalidad Concurrente (Agüero *et al.*, 1997), algo que no sucede tras las lesiones del PBl (Agüero *et al.*, 1997). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que lesiones específicas del subnúcleo Parabraquial Lateral Externo (PBle) interrumpen la modalidad Concurrente tanto del AApG (Zafra *et al.*, 2002) como del AAvg (Mediavilla *et al.*, 2000). Es decir, la participación del Pble parece ser relevante sólo cuando las demandas de la tarea pertenecen a la modalidad Concurrente (Mediavilla *et al.*, 2000; Zafra *et al.*, 2002).

En esta línea, la Estimulación Eléctrica del Pble, una técnica experimental que ha demostrado ser un sustituto adecuado del estímulo visceral en procedimientos de AAvg (Gallo *et al.*, 1988; Agüero *et al.*, 1993a), induce aversiones y preferencias por los sabores con los que se asocia (Simón *et al.*, 2007).

Un apoyo adicional sobre la implicación del Pble en la modalidad Concurrente del AAvg proviene de estudios en los que se ha observado su activación, junto a otros núcleos cerebrales, tras manipulaciones de índole visceral del tipo de la Estimulación Eléctrica del Nervio Vago (Gieroba y Blessing, 1994), la distensión gástrica (Suemori *et al.*, 1994; Baird *et al.*, 2001a, b; Berthoud *et al.*, 2001; Vrang *et al.*, 2003; Mazda *et al.*, 2004) o la administración de productos nocivos (habitualmente utilizados para inducir AAvg) tales como el NaCl hipertónico (Kobashi *et al.*, 1993) o el LiCl (Yamamoto *et al.*, 1992; Gu *et al.*, 1993; Swank y Bernstein, 1994).

Por su parte, las lesiones del PBl (generalmente no totales) bloquean el aprendizaje en la modalidad Secuencial, inducida por la administración intragástrica de NaCl hipertónico (Agüero *et al.*, 1993a), Paroxina (López-Grancha *et al.*, 2006), Escopolamina (Cubero y Puerto, 2000a) y/o por la Estimulación Eléctrica del Área Postrema (Agüero *et al.*, 1993b), presumiblemente al interrumpir la información humoral viscerosensorial proveniente principalmente desde la propia Área Postrema

(Borison, 1989; Shapiro y Miselis, 1985; Van der Kooy y Koda, 1983; Coil y Norgren, 1981; Coil *et al.*, 1978; Arnedo *et al.*, 1990; Bernstein *et al.*, 1992; Gallo *et al.*, 1990, 1991; Agüero *et al.*, 1993a, b).

Finalmente, algunos estudios han demostrado la activación del PBI en respuesta a la administración de productos aversivos habitualmente utilizados para inducir el AAvG Secuencial, entre ellos, el LiCl, la Estricnina, la Cocaína y las Anfetaminas (Sakai y Yamamoto, 1997; Yamamoto *et al.*, 1992), el Alcohol (Sakai y Yamamoto, 1997; Thiele *et al.*, 1996) o la Gastrina (Yakabi *et al.*, 2002), así como en respuesta a la administración gástrica de algunos compuestos nutritivos tales como la Sacarosa (Yamamoto y Sawa, 2000a, b) o a una ingesta de alimentos que producen Saciación (Rinaman *et al.*, 1998).

En resumen, en función de la tarea, del tipo de estímulo aversivo-visceral utilizado y de su vía de administración, se puede activar un circuito anatómico u otro y una modalidad de aprendizaje u otra. Las lesiones de determinadas estructuras, tal y como se ha expuesto más arriba, afecta, por tanto, diferencialmente a las dos modalidades de AAvG, Vagal/a Corto Plazo (Concurrente) y Humoral/a Largo Plazo (Secuencial) (Arnedo *et al.*, 1990).

### **2.3.2. IMPLICACIÓN FUNCIONAL DE LA AMÍGDALA.**

Entre los primeros estudios sobre la Amígdala, y sus implicaciones funcionales, se deben destacar los realizados por Klüver y Bucy en 1939 (Bucy y Klüver, 1955). En ellos se describen los síntomas inducidos en monos que habían sido sometidos a una ablación bilateral del Lóbulo Temporal Medial (incluyendo la Amígdala). Entre los principales síntomas que mostraban estos animales se encuentran la ausencia de miedo a objetos amenazantes y la incapacidad para discriminar visualmente entre objetos comestibles y no comestibles (Bucy y Klüver, 1955; Jones y Mishkin, 1972; Aggleton y Passingham, 1981).

En la actualidad se considera que la Amígdala desempeña una función central en la apreciación del significado de los estímulos ambientales específicos para la especie (Amaral *et al.*, 1992), particularmente en la implicación de la asignación de significado emocional o valencia a eventos a través del establecimiento de aprendizajes asociativos (Hatfield y Gallagher, 1995). Esta función capital para la supervivencia facilita la selección de un alimento apropiado o pareja, evitando las sustancias o situaciones peligrosas.

En este contexto hay que destacar necesariamente los estudios sobre Miedo Condicionado que han analizado con todo detalle las bases neurobiológicas de esta emoción concreta y que tan estrechamente está relacionada con la Amígdala (Davis, 1992; LeDoux, 1992; Onishi y Xavier, 2010; Cousens *et al.*, 2012).

Estos estudios han puesto de manifiesto dos subsistemas (LeDoux, 2000; Torras *et al.*, 2001) que convergen en la Amígdala, concretamente en el Núcleo Lateral (La), que recibe: 1) información sensorial directamente del Tálamo o 2) a través de conexiones indirectas Tálamo-Corteza-La (Romanski y LeDoux, 1992; Davis *et al.*, 1993; Maren, 1996; Quirk *et al.*, 1997; Pitkänen *et al.*, 1997).

De hecho, esta participación de la Amígdala en el aprendizaje y en el almacenamiento (memoria) del condicionamiento del miedo implicarían procesos de Potenciación a Largo Plazo (PLP) (Clugnet y LeDoux, 1990; Fanselow y Kim, 1994; Rogan y LeDoux, 1995; Maren, 1999).

En el contexto de este sistema anatómico se considera al subnúcleo CeA como la principal puerta de salida del Complejo Amigdalino y, así, sus lesiones interfieren con la expresión de estas respuestas condicionadas (Campeau y Davis, 1995; Hitchcock y Davis, 1991).

Todos estos datos llevaron, en la década de los 80, a un buen número de investigadores a examinar la implicación de la Amígdala en el AAvG.

Inicialmente, se ha podido observar la activación, entre otras, de las neuronas del CeA tras la administración de varios de los principales agentes aversivos utilizados en el AAvG, por ejemplo, NaCl y HCl administrados intragástricamente (Michl *et al.*, 2001); LiCl intraperitoneal (Yamamoto *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1997) e intragástrico (Yamamoto y Sawa, 2000a); Etanol intraperitoneal (Thiele *et al.*, 2000) e intragástrico (Yamamoto y Sawa, 2000a); Sacarosa intragástrica (Yamamoto *et al.*, 1997; Yamamoto y Sawa, 2000a) e intraoral (Yamamoto *et al.*, 1997); y Gastrina intravenosa (Yakabi *et al.*, 2002). Esta activación amigdalina concreta requiere, aunque no todos los autores coinciden en este punto (por ejemplo, Gu *et al.*, 1993), de la participación del NTS (Haupt *et al.*, 1994; Swank y Bernstein, 1994; Swank *et al.*, 1995; Schafe y Bernstein, 1996) y puede ser bloqueada mediante la administración de Vagotomías (Michl *et al.*, 2001).

### **2.3.2.1. La controversia sobre las “Vías de Paso” en la Amígdala.**

Aunque las primeras investigaciones, con lesiones electrolíticas de la Amígdala (generalmente del BLA), mostraron repetidamente un bloqueo de la adquisición del AAvG (Nachman y Ashe, 1974; Aggleton *et al.*, 1981; Lasiter, 1982; Lasiter y Glanzman, 1982; Fitzgerald y Burton, 1983; Bermudez-Rattoni *et al.*, 1986), estos resultados fueron pronto cuestionados (Dunn y Everitt, 1988). Estos autores utilizaron dos tipos de técnicas lesivas: una electrolítica y otra neurotóxica, para mostrar que sólo las primeras producían una atenuación del AAvG, considerando así que las lesiones electrolíticas afectaban a la adquisición al causar un daño accidental de la fibras de paso (Lasiter, 1982; Fitzgerald y Burton, 1983; Yamamoto, 1984; Simbayi *et al.*, 1986; Simbayi, 1987; Dunn y Everitt, 1988; Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991; Gallo *et al.*, 1992; Roldan y Bures, 1994; Schafe *et al.*, 1998). De hecho la vía PBm-Corteza Insular aparece confinada dentro de los límites de CeA (Frey *et al.*, 1997), por lo que la destrucción electrolítica llevada a cabo en estos experimentos podría haber destruido dicha conexión, afectando indirectamente a la Corteza Insular.

Sin embargo, investigaciones relacionadas, controlando la integridad o no de la vía PBm-Corteza Insular, han comprobado que la interrupción de esta vía sólo atenúa el AAvG (Yamamoto *et al.*, 1980; Dunn y Everitt, 1988; Yamamoto y Fujimoto, 1991; Yamamoto, 1993; Yamamoto *et al.*, 1994) y que, mientras las lesiones electrolíticas específica del CeA (Frey *et al.*, 1997) no tienen efecto sobre el AAvG (Kemble *et al.*, 1979; Galaverna *et al.*, 1993), las lesiones electrolíticas de BLA, que no interfieren con la vía, sí impiden la adquisición de AAvG (Aggleton *et al.*, 1981).

La hipótesis de las “Fibras de Paso” ha sido examinada de nuevo por Morris y colaboradores (1999) utilizando ácido iboténico en el BLA y el CeA. Los resultados mostraron que sólo las lesiones que destruían más del 90% del volumen del BLA interrumpían el AAvG, mientras que las lesiones del CeA no producían efecto alguno. Morris y colaboradores (1999) concluyen que el BLA sería la estructura crítica para la integración de la cualidad sensorial del gusto con la señal visceral nociva/tóxica y sus consecuencias afectivas.

Esta última propuesta ha sido apoyada consistentemente por los estudios llevados a cabo por el grupo de Yamamoto (Yamamoto y Fujimoto, 1991; Yamamoto, 1993; Yamamoto *et al.*, 1994a; Sakai y Yamamoto, 1999) en los cuales el AAvG es

bloqueado mediante lesiones excitotóxicas del 90% de la extensión del BLA. La relación anatómica del BLA con el Estriado y con la Corteza Motora ofrece una ruta a través de la cual podría expresarse los aspectos motores del comportamiento aversivo.

En cualquier caso, a lo largo de los años los estudios con técnicas lesivas en la Amígdala (dentro del AAvG) han obtenido resultados contradictorios, que se pueden concretar en tres posiciones distintas: a) para algunos autores es posible interrumpir por completo la adquisición del AAvG (Nachman y Ashe, 1974; Aggleton *et al.*, 1981; Yamamoto y Fujimoto, 1991; Yamamoto, 1993; Yamamoto *et al.*, 1994a; Schafe *et al.*, 1998; Sakai y Yamamoto, 1999; Morris *et al.*, 1999); b) otros investigadores sólo han obtenido efectos atenuadores (Fitzgerald y Burton, 1983; Gallo *et al.*, 1992); y c) mientras que finalmente un tercer grupo ha observado que las lesiones de la Amígdala no generan efecto alguno (Lasiter, 1982; Lasiter y Glanzman, 1982; Simbayi *et al.*, 1986; Simbayi, 1987; Dunn y Everitt, 1988; Bermudez-Rattoni y McGaugh, 1991; Schafe *et al.*, 1998).

### **2.3.2.2. Algunas alternativas teóricas.**

Existen algunas alternativas que pueden explicar esta falta de consenso: a) la extensión del daño de los distintos subnúcleos individuales de la Amígdala es ocasionalmente un parámetro ignorado; b) se han utilizado gran variedad de protocolos de AAvG; c) existe también un amplio espectro de estímulos gusto-olfatorios y de agentes nocivos para inducir malestar visceral; y d) se han utilizado diferentes métodos para estudiar la implicación de la Amígdala en el AAvG (Lamprecht y Dudai, 2000).

Otro factor habitualmente ignorado es la relevancia de la información olfatoria que no siempre ha sido tomada en cuenta como señal sensorialmente esencial en este proceso adquisitivo. De hecho, algunos autores sugieren que el término AAvG debería ser sustituido en la mayoría de los casos por el de Aprendizaje Aversivo al Sabor (AAvS), entendiendo por “sabor” la suma del componente “gustativo” y “olfatorio” de un estímulo (Bures *et al.*, 1998; Rollins *et al.*, 2001; Sclafani *et al.*, 2001; Capaldi *et al.*, 2004; Touzani y Sclafani, 2005).

De hecho, se ha demostrado repetidamente que tanto el componente “gustativo” como el “olfatorio” pueden ser asociados individualmente con el malestar visceral (De Araujo *et al.*, 2003; Capaldi *et al.*, 2004).

Así, los estudios sobre el Aprendizaje Aversivo Olfatorio (AAvO) han mostrado que tanto las lesiones del CeA (Hitchcock y Davis, 1986, 1987; Sananes y Campbell, 1989), como las manipulaciones farmacológicas desactivadoras del BLA (Miserendino *et al.*, 1990; Campeau *et al.*, 1992; Davis, 1992; Fanselow y Kim, 1994; Maren *et al.*, 1996), impiden selectivamente la adquisición de las respuestas condicionadas olfatorias de miedo.

Adicionalmente, el Aprendizaje Aversivo Olfatorio (AAvO), en contraste con el AAvg, sólo puede ser adquirido si el estímulo visceral aversivo es administrado al animal inmediatamente antes o simultáneamente a la presentación del estímulo olfatorio (García *et al.*, 1966; Rusiniak *et al.*, 1979; Ferry y Di Scala, 1997), una característica distintiva de la modalidad Concurrente (a Corto Plazo) del AAvg (Arnedo y Puerto, 1986; Arnedo *et al.*, 1989, 1990, 1991; Arnedo *et al.*, 1993; Mediavilla *et al.*, 1998, 1999, 2001).

El hecho de que el estímulo olfatorio *per se* no ofrezca la posibilidad de generar un trazo de memoria lo suficientemente potente como para poder ser asociado con un estímulo aversivo demorado (García *et al.*, 1966; Rusiniak *et al.*, 1979; Ferry y Di Scala, 1997) ha llevado a proponer que los animales sólo adquieren una fuerte aversión al estímulo olfatorio asociado al estímulo aversivo demorado cuando el primero era relacionado con un estímulo gustativo durante el proceso de adquisición (Rusiniak *et al.*, 1979; Durlach y Rescorla, 1980). Este modelo ha sido denominado Aprendizaje Aversivo Olfatorio Potenciado por el Sabor (AAvOPS), una modalidad de aprendizaje que aparentemente resulta de la asociación entre el débil trazo del estímulo olfatorio y el estímulo aversivo retardado, valiéndose de la presencia del estímulo gustativo. De alguna manera se modificaría la característica del trazo de memoria durante la adquisición (Ferry y Di Scala, 2000), una peculiaridad por otra parte distintiva de la modalidad Secuencial (a Largo Plazo) del AAvg (Arnedo y Puerto, 1986; Arnedo *et al.*, 1989, 1990, 1991; Arnedo *et al.*, 1993; Mediavilla *et al.*, 1998, 1999, 2001).

Tanto a través del modelo del AAvo como del AAvoOPS se ha investigado la implicación de la Amígdala en estos aprendizajes. Así, se considera que el BLA, pero no el CeA, es fundamental en la adquisición del AAvo (Ferry *et al.*, 1999) y del AAvoOPS (Bermudez-Rattoni *et al.*, 1986; Hatfield y Gallagher, 1995; Ferry y Di Scala, 2000), y se sugiere que el BLA (y particularmente sus receptores NMDA) estaría implicado selectivamente en los procesos de adquisición de aversiones

olfatorias y, más precisamente, en el proceso de memoria que apoya la asociación entre el estímulo olfatorio y el estímulo aversivo retardado (Ferry y Di Scala, 2000). Estas manipulaciones no afectan al procesamiento sensorial de la información olfatoria (Hatfield y Gallagher, 1995).

Otras investigaciones, en fin, han implicado al BLA, no sólo en adquisición, sino también en la consolidación de la memoria basada en la información olfatoria así como de las memorias basadas en otras modalidades sensoriales (Cousens y Otto, 1998; Kilpatrick y Cahill, 2003).

## **2.4. BASES NEUROQUÍMICAS IMPLICADAS EN EL APRENDIZAJE AVERSIVO GUSTATIVO.**

Al principio la utilización de las distintas sustancias para inducir AAvG se basaban, sobre todo, en los efectos eméticos o aversivos que éstas producían así como en sus efectos farmacológicos sobre unos u otros neurotransmisores (Bures *et al.*, 1998).

Así, por ejemplo, la implicación de los péptidos endógenos en la inducción de AAvG ha sido ampliamente estudiada en relación con la administración de Colicistoquinina (CCK), un neuropéptido intestinal considerado como uno de los candidatos participantes en los procesos de Saciación. En este sentido, existen numerosos estudios que indican que la CCK disminuye la ingesta de comida más por el malestar que causa (Deutsch y Parsons, 1981; Smith *et al.*, 1982; Sturdevant y Goetz, 1976; De Montigny, 1989; Swerdlow *et al.*, 1983) o por modular las propiedades hedónicas de los alimentos (Waldbilling y Callaghan, 1980; Hsiao y Deupree, 1983), que por inducir Saciación propiamente dicha.

La significación del Sistema Opiáceo en los procesos del AAvG es controvertida. Algunos estudios (ya mencionados anteriormente), dentro de la modalidad apetitiva del Aprendizaje Interoceptivo Concurrente (AApG), sugieren que el antagonismo opiáceo bloquea tanto la adquisición como la expresión de las preferencias por la dieta (Levine *et al.*, 2002). Sin embargo, experimentos llevados a cabo por Bodnar y Sclafani consideran que los antagonistas opiáceos no afectan al desarrollo de preferencias gustativas, aunque la Naltrexona (antagonista opiáceo) disminuye la ingesta de sabores asociados con Sacarosa (Yu *et al.*, 1999; Azzara *et al.*, 2000; Frisina y Sclafani, 2002; Baker *et al.*, 2004). Cuando se utilizan tareas de Condicionamiento de Preferencia hacia un Lugar (CPL), se observa que la Naltrexona inhibe la

expresión pero no la adquisición del lugar preferido asociado con Sacarosa (Delameter *et al.*, 2000). En efecto, se observó que la Naltrexona después del periodo de adquisición reducía el tiempo que el animal pasaba en el compartimento del laberinto asociado al sabor dulce pero no impedía que los animales fuesen capaces de aprender las preferencias espaciales.

Otros estudios han mostrado que la administración de antagonistas opiáceos reduce las preferencias por soluciones apetitosas como la Sacarina o la Sacarosa (Le Magnen *et al.*, 1980; Levine *et al.*, 1982; Le Magnen, 1992; Agmo *et al.*, 1995).

En relación con estos últimos datos, existen estudios que han observado que la administración intraoral de nutrientes induce preferencias olfatorias que son bloqueadas con antagonistas opiáceos (Shide y Blass, 1991). La vía intraoral de administración del reforzador, utilizada por estos estudios, hace posible la detección de éste de una forma rápida (característica distintiva de la modalidad Concurrente).

Por otra parte, existen investigaciones que implican a los receptores NMDA en la formación de la memoria del sabor, sobre todo en Aprendizaje Aversivo Olfatorio Potenciado por el Sabor (AAvOPS). Así, se ha demostrado que la administración sistémica, intraventricular o directamente en el subnúcleo BLA de un antagonista NMDA (D-APV) bloquea el AAOPS, sin interferir en la expresión de este aprendizaje, ni al AAOG, ni al condicionamiento AAvo (Willner *et al.*, 1992; Hatfield y Gallagher, 1995). Estos resultados sugieren que la neurotransmisión glutamatérgica está implicada en la asociación del gusto con el olor (sabor), pero no en el procesamiento de cada una de estos índices sensoriales independientemente (Bures *et al.*, 1998).

Finalmente, los sistemas neuroquímicos implicados en las respuestas al estrés también han sido relacionados con la adquisición del AAOG. Así, por ejemplo, se ha demostrado que existe un aumento de los niveles en plasma de hormonas relacionadas con el estrés (por ejemplo, adrenocorticoides) tras la adquisición del AAOG (Smotherman *et al.*, 1976) aunque, al parecer, la respuesta hormonal *per se* no es crítica para esta modalidad de aprendizaje (Ader *et al.*, 1978).



### **3. CONDICIONAMIENTO HACIA UN LUGAR.**

#### **3.1. CARACTERÍSTICAS DEL CONDICIONAMIENTO HACIA UN LUGAR.**

En el Condicionamiento hacia un Lugar (CL) las propiedades motivacionales del estímulo administrado (fármaco u otra sustancia) son asociadas con estímulos del entorno, inicialmente neutros, que se convierten así en estímulos capaces de generar conductas de aproximación/evitación cuando el sujeto se encuentra expuesto a ellos nuevamente (Tzschentke, 1998).

Este modelo ha resultado ser un procedimiento eficaz para la investigación de los sustratos neurales del aprendizaje y la memoria (Holahan, 2005), particularmente en relación con en el estudio de los mecanismos cerebrales del refuerzo (Condicionamiento de Preferencia hacia un Lugar, CPL), tanto en relación con la comida (McDonald y White, 1993; White y McDonald, 1993; Lepore y Franklin, 1996; Packard y McGaugh, 1992, 1996; McDonald y Hong, 2004), las soluciones apetitivas (Stefurak y Van der Kooy, 1994), la interacción social/sexual (Tzschentke, 1998) o con la Estimulación Eléctrica Intracerebral (Simón *et al.*, 2007). De hecho, este modelo se ha utilizado, sobre todo, para estudiar las consecuencias afectivas de la mayoría de la drogas de abuso (Bechara *et al.*, 1993; Calcagnetti y Schechter, 1994, Maldonado *et al.*, 1997; Bardo y Bevins, 2000; Zarrindast *et al.*, 2002a, b; Duarte *et al.*, 2003; Francès *et al.*, 2004a, b; Le Foll y Goldberg, 2005a, b y c). Este procedimiento permite estudiar también las propiedades motivacionales aversivas de las drogas de abuso (por ejemplo, el Síndrome de Retirada tras la administración crónica de morfina) y otros tratamientos (por ejemplo, LiCl), cuyos efectos no se pueden estudiar mediante modelos de auto-administración (Spanagel *et al.*, 1992; Shippenberg y Elmer, 1998). Es el denominado Condicionamiento Aversivo hacia un Lugar (CAL).

El Condicionamiento hacia un Lugar está considerado teóricamente como una modalidad de Condicionamiento Clásico (C.C.), en el que las consecuencias motivacionales de un producto (aversivo/apetitivo) son asociadas con determinados estímulos del lugar. Así, después de algunos ensayos de asociación, entre el producto (Estímulo Incondicionado, EI) y los estímulos neutros (Estímulo Condicionado, EC), un sujeto permanecerá menos/más tiempo en presencia del EC que en presencia de otros estímulos que no han sido asociados con el EI (Le Foll y Goldberg, 2005a, b, c; Holahan, 2005).

Por otra parte, aunque la modalidad Concurrente (a Corto Plazo) y Secuencial (a Largo Plazo) fue desarrollada dentro del Aprendizaje Aversivo Gustativo (AAvG) (Arnedo *et al.*, 1990, 1991; Gallo *et al.*, 1992; Agüero *et al.*, 1993a, b; Agüero *et al.*, 1997; Mediavilla *et al.*, 1998, 1999, 2001, 2005), esta distinción también puede establecerse utilizando el modelo del Condicionamiento hacia un Lugar (Simón *et al.*, 2007). La modalidad Secuencial asociaría, en días alternos, cada compartimento a unas consecuencias (aversivas/apetitivas). Por su parte, el procedimiento Concurrente permitiría acceder al animal a los dos entornos estimulares del laberinto (en cada sesión), pero sólo en uno de ellos los animales recibirían el tratamiento pertinente (Simón *et al.*, 2007).

En el Condicionamiento Concurrente hacia un Lugar (a Corto Plazo) llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral el animal deambula libremente por el laberinto pero sólo recibe Estimulación Eléctrica en una de las zonas (Vezina y Stewart, 1987). El animal puede dirigirse libremente hacia la zona donde recibe estimulación o escapar de ella, asociando así las consecuencias de la estimulación o su ausencia con unos determinados estímulos del entorno (Tzschentke, 1998).

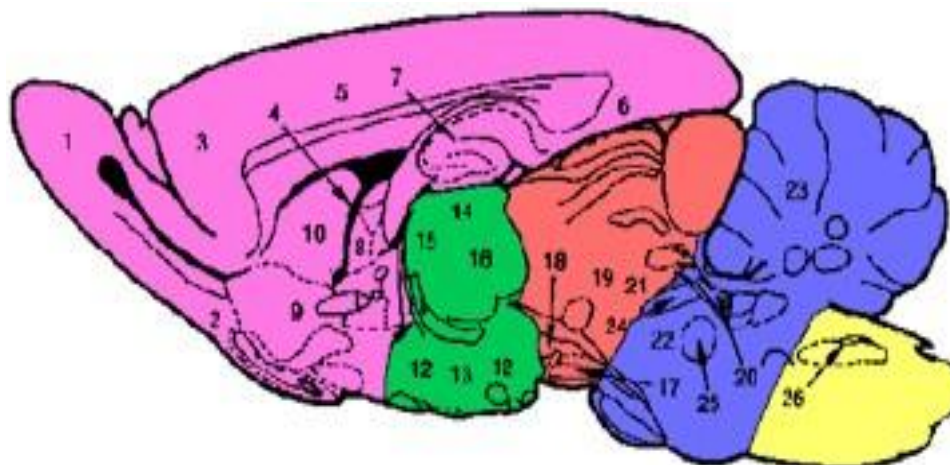
## **3.2. MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS IMPLICADOS EN LA ADQUISICIÓN DEL CONDICIONAMIENTO HACIA UN LUGAR.**

### **3.2.1. EL SISTEMA DE RECOMPENSA CEREBRAL.**

El estudio de los mecanismos cerebrales de recompensa se inicia a partir del descubrimiento de James Olds y Peter Milner (1954) del fenómeno de la Auto-Estimulación Eléctrica Intracerebral (AEEIC). Los animales aprenden comportamientos instrumentales que les permiten auto-administrarse corrientes eléctricas en determinadas regiones cerebrales (Olds y Milner, 1954; Milner, 1989).

A lo largo de los años se han identificado numerosas regiones cerebrales asociadas a este Sistema de Recompensa (Figura 0.10) y que se localizan principalmente, aunque no exclusivamente, en torno al Haz Prosencefálico Medial. Este conjunto de fibras, de diferente longitud, origen y destino (Nieuwenhuys *et al.*, 1982; Veening *et al.*, 1982), está orientado al parecer en dirección rostro-caudal (vía descendente), extendiéndose desde el Prosencéfalo hasta el Tronco Cerebral, donde los umbrales de auto-estimulación son especialmente bajos y las tasas de respuesta más altas (Routtenberg, 1976; Olds y Fobes, 1981; Wise y Rompré, 1989; Milner, 1989; Yeomans, 1990; Gallistel *et al.*, 1996; Arvanitogiannis *et al.*, 1997;

Arvanitogiannis *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 1997; Panagis *et al.*, 1997; Konkle *et al.*, 1999; Nakahara *et al.*, 2001). Así, se han identificado regiones troncoencefálicas, tan caudales como el Núcleo del Tracto Solitario, Médula Dorsolateral, Núcleo Motor del Trigémino y Núcleos Cerebelosos Internos, todos ellos capaces de sustentar esta conducta de AEEIC (Wise y Rompré, 1989; Kandel *et al.*, 2000) (Figura 0.10).



Telencefalo	Diencefalo	Mesencefalo	Metencefalo
1. Bulbo olfatorio.	11. Fórnix.	17. Sustancia negra.	23. Cerebelo.
2. Corteza prepiriforme.	12. Hipotálamo lateral.	18. Área tegmental ventral.	24. Pedículo sup. del cerebelo.
3. Corteza prefrontal.	13. Hipotálamo ventromedial.	19. Sustancia gris periaqueductal.	25. N. motor del Nervio trigémino.
4. Órgano subfornical.	14. N. dorsomedial del Tálamo.	20. N. mesencefálico del nervio trigémino.	
5. Corteza cingulada.	15. N. paratenial del Tálamo.	21. Rafe dorsal.	
6. Corteza entorrinal.	16. N. central del Tálamo.	22. Rafe medial.	
7. Hipocampo.			
8. Septum.			
9. N. Accumbens.			
10. Cuerpo estriado.			
No mostrados:			
Globo pálido.			
Amígdala.			
Habérmula.			
			<b>Metencefalo</b>
			26. N. del tracto Solitario.

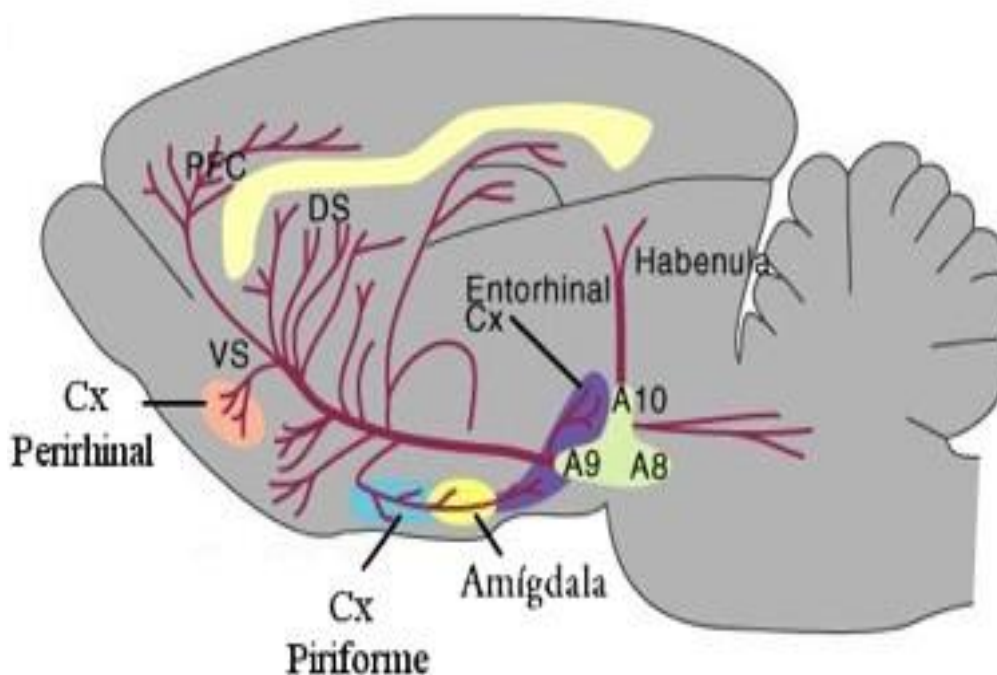
**Figura 0.10.** Principales puntos de Auto-Estimulación Eléctrica Intra-Cerebral en el encéfalo de la ratona (Adaptado de Phillips y Fibiger, 1989).

Inicialmente se pensaba que la mayoría de las zonas cerebrales que sustentan la AEEIC estaban integradas, de un modo u otro, por las fibras del Haz Prosencefálico Medial, asumiendo así la existencia de un sistema neural general que habitualmente sería activado por las recompensas de índole natural y sería responsable del refuerzo de los distintos comportamientos (Phillips, 1984). Sin embargo, algunos estudios

empleando, por ejemplo, pulsos dobles de corriente, técnicas de colisión de impulsos nerviosos, ha disociado entre el Sistema Mesocorticolímbico y el Haz Prosencefálico Medial, considerando a ambos sistemas independientes, entre otros casos, con respecto a la velocidad de conducción de la información nerviosa (lenta vs. rápida, respectivamente), así como en la dirección de éstos (ascendente vs. descendente, respectivamente) (Wise y Rompré, 1989; Bielajew y Shizgal, 1986; Gallistel *et al.*, 1996; Wise, 1996, 1998; 2000). Más aún, muchos otros estudios con técnicas lesivas (Valenstein y Campbell, 1966; Clavier y Fibiger, 1977; Phillips y Fibiger, 1978; Phillips y LePiane, 1982) y farmacológicas (Phillips y Fibiger, 1973; Phillips *et al.*, 1975; Van der Kooy *et al.*, 1978; Franklin y Robertson, 1980; Franklin y Vaccarino, 1983; Hand y Franklin, 1983; Jenkins *et al.*, 1983) han observado que tras bloquear el Haz Prosencefálico Medial la AEEIC sigue siendo posible en otras estructuras cerebrales, descartando así la existencia de un único sistema de recompensa cerebral.

### 3.2.1.1. Implicación del Sistema Dopaminérgico en los Procesos de Recompensa Cerebral.

El Sistema Dopaminérgico Mesocorticolímbico de refuerzo, orientado en dirección caudal-rostral (vía ascendente), proyecta desde el Área Tegmental Ventral hacia diversas estructuras rostrales, entre ellas, el Núcleo Accumbens, el Área Septal, el Tubérculo Olfatorio, la Corteza Prefrontal y la Amígdala (Figura 0.11).



**Figura 0.11:** Sistema Dopaminérgico Mesocorticolímbico. Abreviaturas: A8, A9 y A10, grupos de células dopaminérgicas A8, A9 y A10; Cx, Córtex; VS, Estriado Ventral; DS, Estriado dorsal; PFC, Córtex Prefrontal (Adaptado de Robbins y Everitt, 2002).

Este Sistema Mesocorticolímbico ha sido considerado también como probable sustrato de los efectos recompensantes de los reforzadores naturales (Robbins *et al.*, 1989; Martel y Fantino, 1996), de las drogas de abuso (Di Chiara e Imperato, 1988; Koob, 1992; Fernández-Espejo, 2002), así como de los efectos recompensantes de la Estimulación Eléctrica Intracerebral (Garris *et al.*, 1999; Phillips *et al.*, 2003).

No obstante, algunos estudios, utilizando técnicas lesivas del Sistema Dopaminérgico (Phillips y LePiane, 1982; Wise y Rompré, 1989; Yeomans, 1990), así como otros, con técnicas de inmunohistoquímica *c-fos* (Hunt y McGregor, 1998), han constatado un relativo solapamiento entre las células activadas por AEEIC y las que utilizan Dopamina como neurotransmisor. Así, existen estudios que sugieren que las interacciones dopaminérgicas con neuronas del Núcleo Accumbens no parecen necesarias para la acción reforzante de algunas drogas (Wise, 1998, 2000; Spanagel y Weiss, 1999), concluyendo así que la liberación de Dopamina en el Núcleo Accumbens puede no ser el mecanismo final común para todos los reforzadores (Spanagel y Weiss, 1999; Wise, 2000). Más aún, estudios con animales manipulados genéticamente (carentes de Dopamina) han mostrado que la ausencia de este neurotransmisor en el Núcleo Accumbens no reducía las reacciones afectivas positivas asociadas con un sabor (Cannon y Palmiter, 2003, Cannon *et al.*, 2004), con lo cual concluyen que la Dopamina no es una condición imprescindible para inducir recompensa. En otras palabras, la Dopamina, si bien es un neurotransmisor implicado, podría no ser el único responsable en la codificación de información relacionada con refuerzo (Spanagel *et al.*, 1992; Yeomans *et al.*, 1993; Yeomans y Baptista, 1997; Rada *et al.*, 2000; Cannon y Palmiter, 2003, Cannon *et al.*, 2004).

### **3.2.1.2. Interacción entre el Sistema Dopaminérgico y el Sistema Opiáceo en los Procesos de Recompensa Cerebral.**

En cualquier caso, muchos de los efectos opiáceos observados parecen implicar al Sistema Dopaminérgico tanto anatómica como funcionalmente (Stellar y Corbett, 1989) y, así, se han constatado interacciones entre ellos en estructuras cerebrales del Sistema Mesocorticolímbico, particularmente en el Área Tegmental Ventral, el Núcleo Accumbens y la Amígdala (Koob y Bloom, 1988; Di Chiara y North, 1992; Koob *et al.*, 1993; Noel y Wise, 1995; Burkey *et al.*, 1996; Maldonado *et al.*, 1997; Olmstead y Franklin, 1997a, b; Shippenberg y Elmer, 1998; Tassin, 1998; Hyman, 1999; Koob, 1999; Manzanedo *et al.*, 2001a; Naranjo *et al.*, 2001). Por ello, se ha sugerido que los opiáceos pueden ejercer sus efectos reforzantes tanto directa como

independientemente de la Vía Mesocorticolímbica (Spanagel *et al.*, 1992; Wise, 2000; Bielajew *et al.*, 2003).

Concretamente se ha propuesto que la acción central de los opiáceos puede llevarse a cabo de dos maneras: desinhibiendo a las neuronas dopaminérgicas del Área Tegmental Ventral, lo cual daría como resultado la liberación de Dopamina, por ejemplo, en el Núcleo Accumbens (Wise, 1989; Wise y Bozarth, 1987), o a través también del Núcleo Accumbens, independientemente de la liberación de Dopamina en esta zona (Koob y Bloom, 1988; Di Chiara y North, 1992; Koob, 1999; Tassin, 1998; Shippenberg y Elmer, 1998; Hyman, 1999).

De acuerdo con estas propuestas se ha sugerido que los sistemas dopaminérgicos podrían estar implicados, de algún modo, en el CPL inducido por morfina (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 1995; Tzschentke, 1998), ya que tanto las lesiones en el Núcleo Accumbens, como la infusión de la neurotoxina 6-OHDA en dicho núcleo, reduce el CPL inducido por la administración sistémica de morfina y heroína (Spiraki *et al.*, 1983; Kelsey *et al.*, 1989). Por otro lado, inyecciones sistémicas de antagonistas dopaminérgicos (Haloperidol) o a través de neurotoxinas (6-OHDA) se bloquea el CPL inducido a través de inyecciones opiáceas directamente en el VTA (Phillips y LePiane, 1980, 1982), e igual sucede en el caso de la auto-administración de opiáceos administrados directamente en el VTA (Bozarth y Wise, 1981). Más aún, se ha observado que las propiedades reforzantes de la morfina pueden ser inhibidas en animales tratados con antagonistas dopaminérgicos (Manzanedo *et al.*, 2001a), con inhibidores de la liberación de Dopamina (Manzanedo *et al.*, 2001b), o con roedores transgénicos que carecen de receptores dopaminérgicos (Maldonado *et al.*, 1997). Estos efectos recompensantes de los opiáceos se pueden lograr a través del propio Núcleo Accumbens (Koob y Bloom, 1988), ya que los animales pueden auto-administrarse morfina directamente en dicho núcleo (Olds, 1982), mientras que la administración de un antagonista opiáceo, directamente en dicho núcleo, altera la auto-administración sistémica de heroína (Vaccarino *et al.*, 1985).

Por otra parte, existen otros datos que apoyan la actividad moduladora dopaminérgica facilitando el refuerzo (Schaeffer *et al.*, 1994; Hobbs *et al.*, 1994; Carr y Papadouka, 1994; Carr y Kutchukhidze, 2000) y en la adquisición y expresión del CPL inducido por opiáceos (Carr y White, 1983, 1986; Wise, 1987; Rodríguez de Fonseca *et al.*, 1995; Olmstead y Franklin, 1997a, b; Rezayof *et al.*, 2002). Así, el CPL inducido por comida puede ser bloqueado tras la administración de antagonistas

tanto dopaminérgicos como opiáceos (Agmo *et al.*, 1995). Igualmente, la preferencia por los estímulos asociados con la administración de algunos agonistas opiáceos (Mucha *et al.*, 1982; Shippenberg *et al.*, 1987; Olmstead y Franklin, 1997a, b; Schechter y Calcagnetti, 1998; Contarino *et al.*, 1999; Spiteri *et al.*, 2000; Manzanedo *et al.*, 2001a) puede ser bloqueada igualmente mediante la administración de distintos antagonistas dopaminérgicos (Acquas y Di Chiara, 1992; Rodríguez de Fonseca *et al.*, 1995).

Finalmente, estudios con microdiálisis *in vivo* muestran una reducción en los niveles extracelulares de Dopamina en el Núcleo Accumbens durante el Síndrome de Retirada Opiácea precipitada por antagonistas opiáceos (Acquas *et al.*, 1991; Crippens y Robinson, 1994; Rossetti *et al.*, 1992; Shaham *et al.*, 1996). De hecho, la administración de agonistas dopaminérgicos D2 eliminan las características señales somáticas de retirada opiácea, mientras que los antagonistas de estos receptores desencadenan estos mismos síntomas físicos (Harris y Aston-Jones, 1994).

### **3.2.1.3. Implicación del Sistema Opiáceo en los Procesos de Recompensa Cerebral.**

De todos modos el Sistema Opiáceo puede ejercer sus efectos motivacionales independientemente de la vía ATV-NAcc ya que lesiones localizadas en el Estriado Ventral si bien reducen la eficacia reforzante de los opiáceos auto-administrados por vía intra-venosa, no la eliminan (Zito *et al.*, 1985). De hecho, los animales pueden mantener conductas de auto-administración opiácea en la región CA3 del Hipocampo y en el Hipotálamo Lateral (Stevens *et al.*, 1991; Self y Nestler, 1995).

Como regla general parece bien establecido, tanto en el modelo de AEEIC como de CPL, que los agonistas opiáceos (por ejemplo,  $\beta$ -Funaltrexamina,  $\beta$ -FNA) actúan como recompensantes de la conducta, mientras que los antagonistas opiáceos (por ejemplo, Naloxona) suelen tener efectos contrarios (Stolerman, 1985). No obstante, un examen más pormenorizado de los agonistas opiáceos permite diferenciar entre sus distintos tipos de receptores. Así, por ejemplo, los agonistas opiáceos  $\mu$  y  $\delta$  incrementan la liberación de Dopamina en la Vía Mesocorticolímbica y producen efectos recompensantes y preferencias hacia los estímulos a ellos asociados (Mucha *et al.*, 1982; Shippenberg *et al.*, 1987; Olmstead y Franklin, 1997a, b; Schechter y Calcagnetti, 1998; Contarino *et al.*, 1999; Spiteri *et al.*, 2000; Manzanedo *et al.*, 2001a). Por su parte, los agonistas opiáceos  $\kappa$ , sin embargo, producen un descenso en la

liberación de Dopamina y producen aversión hacia los estímulos asociados con su administración (Iwamoto, 1986; Mansour *et al.*, 1995a, b).

Mayor controversia existe con respecto a los antagonistas opiáceos en estudios de estimulación cerebral recompensante (Bielajew *et al.*, 2003), como estudios que muestran un descenso significativo en la conducta de AEEIC en algunos casos (Stein y Belluzzi, 1978; Schaefer y Michael, 1981, 1985, 1988; Schaefer, 1988; Trujillo *et al.*, 1989a, b; Bielajew *et al.*, 2003; Easterling y Holtzman, 2004), mientras que otros experimentos no han observado dicha supresión (Espósito *et al.*, 1980, 1981; Perry *et al.*, 1981; Freedman y Pangborn, 1984; Trujillo *et al.*, 1989a, b; Simón *et al.*, 2011).

En una serie de experimentos llevada a cabo por este y otros laboratorios se muestra que la administración de antagonistas opiáceos bloquea el CPL inducido por la Estimulación Eléctrica del PBL (Simón *et al.*, 2007), por comida (Agmo *et al.*, 1995), así como por morfina (Mucha *et al.*, 1982; Del Pozo *et al.*, 1996; Shippenberg y Elmer, 1998; Manzanedo *et al.*, 2001b), reduciendo, además, la preferencia por soluciones apetitivas (como la Sacarosa) (Le Magnen *et al.*, 1980; Levine *et al.*, 1982; Shide y Blass, 1991; Le Magnen, 1992; Agmo *et al.*, 1995).

Sin embargo, no puede olvidarse que los antagonistas opiáceos pueden inducir Condicionamiento Aversivo hacia un Lugar (CAL) (Mucha *et al.*, 1982; Stinus *et al.*, 1990; Maldonado *et al.*, 1992; Del Pozo *et al.*, 1996; Shippenberg y Elmer, 1998; Manzanedo *et al.*, 2001b). También precipitan el Síndrome de Abstinencia que se produce con la administración crónica de las drogas de abuso (por ejemplo, morfina, cocaína, etc.) y que provoca el desarrollo de dependencia física así como la aparición de síntomas somáticos (por ejemplo, temblores) y motivacionales (por ejemplo, CAL) (Stinus *et al.*, 1990; Maldonado *et al.*, 1992; Higgins y Sellers, 1994; Gracy *et al.*, 2001; Le Guen *et al.*, 2001, 2003; Veinante *et al.*, 2003; Frenois *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2002a, b).

Más específicamente, utilizando antagonistas opiáceos selectivos para los receptores  $\mu$  ( $\beta$ -Funaltrexamina,  $\beta$ FNA) (Ward *et al.*, 1982; Hayes *et al.*, 1986),  $\delta$  (Naltrindol, NTI) (Drower *et al.*, 1991; Verborgh y Meert, 1999; Stevenson *et al.*, 2000) y  $\kappa$  (Nor-binaltorfimina, BNI) (Takemori y Portoghese, 1987) se ha puesto de manifiesto la principal implicación de los receptores  $\mu$  en los cambios conductuales típicos del Síndrome de Retirada en animales morfino-dependientes (Le Guen *et al.*, 2003). Esta primacía de los receptores  $\mu$  en el Síndrome de Retirada de morfina viene



apoyada además por estudios que utilizan roedores transgénicos, en los que se ha comprobado que sólo aquellos animales que carecían de los receptores opiáceos  $\mu$  no desarrollaban dicho síndrome (Sora *et al.*, 2001; Kieffer y Gavériaux-Ruff, 2002)

### **3.2.2. BASES NEURALES DEL CONDICIONAMIENTO HACIA UN LUGAR.**

#### **3.2.2.1. Implicación del Complejo Parabraquial en el Condicionamiento de Preferencias/Aversiones hacia un Lugar.**

Mientras que, por una parte, lesiones totales de la región Parabraquial no logran bloquear el Condicionamiento de Aversiones hacia un Lugar (CAL) inducido con LiCl (Reilly *et al.*, 1993), otros estudios demuestran que lesiones más específicas de la zona Parabraquial lateral bloquean el CAL, esto es, interrumpen el procesamiento de las propiedades motivacionales-aversivas de la morfina producidas tras la administración intragástrica de esta droga de abuso (Bechara *et al.*, 1993).

Por su parte, la Estimulación Eléctrica del PBle induce Condicionamiento Concurrente de Preferencias (CPL) o Aversiones (CAL) hacia el Lugar con el que se asocia. Estos efectos recompensantes son bloqueados mediante la administración de Naloxona (Simón *et al.*, 2007).

La Naloxona, aunque es un antagonista opiáceo no selectivo, ejerce sus efectos aversivos a través de los receptores opiáceos  $\mu$  principalmente (Skoubis *et al.*, 2001), lo cual permite suponer que la acción inhibitoria de la acción reforzante de la Estimulación Eléctrica del PBle pueda producirse través de dichos receptores (Simón *et al.*, 2007), tan abundantes, por otra parte, en este subnúcleo (Mansour *et al.*, 1995a, b) que está densamente inervado por vías extrínseca y neuronas intrínsecas opiáceas (Finley *et al.*, 1981; Fallon y Leslie, 1986; Standaert *et al.*, 1986; Moga *et al.*, 1990; Wolinsky *et al.*, 1996; Gutstein *et al.*, 1998; Chamberlin *et al.*, 1999; Martin-Schild *et al.*, 1999). También existe en esta región una alta densidad de receptores opiáceos  $\mu$ ,  $\delta$  y  $k$  (Atweh y Kuhar, 1977; Lynch *et al.*, 1985; Sales *et al.*, 1985; Mansour *et al.*, 1988, 1995b; Ding *et al.*, 1996; Chamberlin *et al.*, 1999) que en el caso de los primeros se localizan mayoritariamente en los núcleos PBle, PBl central y PBm. Por su parte, los receptores tipo  $\delta$  y  $k$  han sido localizados mayoritariamente tanto en la zona PBl dorsal como en PBl ventral (Lynch *et al.*, 1985; Mansour *et al.*, 1988, 1995b; Ding *et al.*, 1996). Estos receptores opiáceos  $\mu$  del área PBl han sido implicados en algunos

de los efectos relacionados con la modificación del valor hedónico de los estímulos gustativos (Carr *et al.*, 1991; Moufid-Bellancourt *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 2003).

De acuerdo con la propuesta (mencionada más arriba) que sugiere que las diferentes modalidades recompensantes (esto es, alimentación, sustancias de abuso, estimulación eléctrica, etc.) pudieran utilizar un sustrato neurobiológico común (Berman *et al.*, 1994; Wolinsky *et al.*, 1996; Fernández-Espejo, 2002; Kelley y Berridge, 2002), se ha observado a través de diversos estudios inmunohistoquímicos (*c-fos*) una marcada activación del PBle, junto a otros muchos núcleos cerebrales ciertamente, tras la administración de distintas drogas de abuso (por ejemplo, cocaína, morfina y anfetaminas), pero también de sustancias nutritivas (por ejemplo, glucosa y lactosa), que pueden actuar como reforzadores (Sakai y Yamamoto, 1997; Yamamoto y Sawa, 2000a).

Así y al igual que el Condicionamiento Concurrente hacia un Lugar llevado a cabo por este laboratorio (Simón *et al.*, 2007) e inducido mediante Estimulación Eléctrica del PBle, otros estudios han obtenido resultados similares, aunque ahora utilizando reforzadores naturales (Arnould y Agmo, 1999). Este hecho sugiere que la Estimulación Eléctrica del PBle puede haber reproducido artificialmente un efecto (Simón *et al.*, 2007), que en otras circunstancias evoca las drogas de abuso o los reforzadores naturales (Kelley y Berridge, 2002).

### **3.2.2.2. Implicación de la Amígdala en el Condicionamiento de Preferencias/Aversiones hacia un Lugar.**

Se ha comprobado repetidamente que las lesiones de la Amígdala bloquean el Condicionamiento de Preferencia hacia un Lugar (CPL) inducido mediante reforzadores naturales (por ejemplo, comida) y drogas de abuso (por ejemplo, cocaína) (Everitt *et al.*, 1991; Hiroi y White, 1991; McDonald y White, 1993; White y McDonald, 1993; McIntyre *et al.*, 1998; Zarrindast *et al.*, 2002b; Everitt *et al.*, 2003; McDonald y Hong, 2004). Este aprendizaje ha sido considerado como un ejemplo de Reforzamiento Condicionado (Estímulo-Refuerzo, E-Rf) (White y McDonald, 2002), una interpretación compatible con los estudios que relacionan a la Amígdala con el Condicionamiento Pavloviano (LeDoux *et al.*, 1990; Davis, 1992) y el Reforzamiento Condicionado (Jones y Mishkin, 1972; Everitt y Robbins, 2000; Everitt *et al.*, 2003).

Dos subnúcleos amigdalinos (BLA y CeA) han sido especialmente examinados en relación con el Sistema Dopaminérgico Mesocorticolímbico y la motivación de

incentivo (Phillips *et al.*, 2003). Cada uno de estos dos subnúcleos amigdalinos podría desempeñar funciones particulares en la motivación apetitiva y aversiva (Killcross *et al.*, 1997; Kruzich y See, 2001). En palabras de Killcross y asociados (1997), “el BLA formaría parte del sistema responsable de comportamientos de elección voluntaria o instrumental basados en eventos emocionales, mientras que el CeA estaría implicado, más claramente, en respuestas condicionadas pavlovianas automáticas evocadas por estímulos motivacionalmente destacados (salientes)”.

Sin embargo, alternativamente LeDoux y asociados han propuesto un procesamiento serial, en el cual la información transcurriría desde el subnúcleo amigdalino Lateral (La) hasta el CeA (Pascoe y Kapp, 1987; Sananes y Davis, 1992; LeDoux, 2000; Amorapanth *et al.*, 2000).

En cualquier caso, todos estos autores explican las lesiones de la Amígdala en cuanto estructura que forma parte del Sistema Dopaminérgico Mesocorticolímbico y relacionada por tanto con los sistemas cerebrales que procesan las propiedades recompensantes de las drogas de abuso (Koob, 1992; Fernández-Espejo, 2002), de los reforzadores naturales (Robbins *et al.*, 1989; Martel y Fantino, 1996) y de los efectos recompensantes de la Estimulación Eléctrica Intracerebral (Garris *et al.*, 1999; Phillips *et al.*, 2003).

La relación de la Amígdala con el Sistema Dopaminérgico es relevante desde la perspectiva de sus características anatómicas y funcionales (Phillips *et al.*, 2003) y en este sentido ha sido relacionada con la conducta alimenticia (King *et al.*, 1994; King *et al.*, 1996; Nishijo *et al.*, 2000), sexual (Kling y Brothers, 1992) o la modulación del aprendizaje asociativo sensorial (Wilensky *et al.*, 2000).

En este contexto, algunos autores han destacado específicamente al subnúcleo central amigdalino (CeA) como sustrato relevante del Reforzamiento Condicionado (E-Rf) y particularmente a sus conexiones con el Área Tegmental Ventral y el Núcleo Accumbens a las que han considerado las responsables de los efectos reforzantes de algunas drogas adictivas (Di Chiara y North, 1992; Koob *et al.*, 1993, 1998; Naranjo *et al.*, 2001; Georges y Aston-Jones, 2002; Hasue y Shammah-Laguado, 2002; Baxter y Murray, 2002; Gottfried *et al.*, 2003; Phillips *et al.*, 2003; See *et al.*, 2003). Así, se ha puesto de manifiesto que algunos de los subnúcleos amigdalinos, incluido el CeA, pueden sustentar la Estimulación Eléctrica recompensante (Kane *et al.*, 1991; Panagis *et al.*, 1995; Touzani y Velley, 1998).

Más aún, se ha demostrado que la Estimulación Eléctrica de las principales zonas cerebrales de refuerzo (incluido el Hipotálamo Lateral) suelen estar asociada con incrementos en la actividad celular de diversos subnúcleos amigdalinos, entre ellos, el CeA (Arvanitogiannis *et al.*, 1996; Hunt y McGregor, 1998; Touzani y Velley, 1998; Nakahara *et al.*, 1999).

Algunos autores han implicado también a la Amígdala en las propiedades reforzantes de los opiáceos, en los procesos de adquisición y expresión del CPL inducido por morfina (Zarrindast *et al.*, 2002b) y, particularmente al CeA, tanto en la acción endógena (Zhu y Pan, 2004, 2005) como exógena (Criado y Morales, 2000) de los opiáceos.

Particularmente, la región Central de la Amígdala ha sido relacionada con el Síndrome de Abstinencia Opiácea (Calvino *et al.*, 1979; Rassnick *et al.*, 1993; Stornetta *et al.*, 1993; Gracy *et al.*, 2001; Le Guen *et al.*, 2001, 2003; Frenois *et al.*, 2002; Zarrindast *et al.*, 2002b; Veinante *et al.*, 2003; Nakagawa *et al.*, 2005). Esta división central incluye a los subnúcleos CeA y la parte lateral del Núcleo Lecho de la Estría Terminalis (NLETl) (Alheid *et al.*, 1995) y ha sido considerada como el sustrato neural responsable de los síntomas motores y motivacionales del Síndrome de Abstinencia (Calvino *et al.*, 1979; Aston-Jones *et al.*, 1999; Delfs *et al.*, 2000; Gracy *et al.*, 2001; Frenois *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2002; Veinante *et al.*, 2003).

Así, la Amígdala, y concretamente el CeA, podría ser también uno de los componentes críticos implicados en la relación entre la información aversiva (incluyendo la abstinencia de morfina) con las emociones de índole negativa (Bernard y Besson, 1990; Turner y Herkenham, 1991; Bernard *et al.*, 1993; McDonald y Mascagni, 1996). Estas conclusiones se ven apoyadas (en estudios de *c-fos*) por la activación que se produce en esta región tras la administración de una gran variedad de estímulos de carácter aversivo (por ejemplo, LiCl o NaCl) (Swank, 1999; Michl *et al.*, 2001; Frenois *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2003).

Más aún, se ha observado que el tratamiento con antagonistas opiáceos incrementa específicamente la expresión de *c-fos* en diversas estructuras cerebrales relacionadas con la dependencia de los narcóticos, y entre ellas, la Amígdala, y más concretamente, el CeA (Higgins y Sellers, 1994; Carr *et al.*, 1999; Gestreau *et al.*, 2000; Gracy *et al.*, 2001; LeGuen *et al.*, 2001, 2003; Frenois *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2005b). Asimismo, se ha comprobado que las lesiones específicas del CeA (Kelsey y Arnold, 1994; Watanabe *et al.*, 2002b; Nakagawa *et al.*, 2005b) o microinyecciones de

antagonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en este subnúcleo (Watanabe *et al.*, 2003), atenúan el CAL inducido por retirada de morfina.

Sin embargo, si bien los receptores opiáceos están habitualmente muy representados en las áreas cerebrales relacionadas con los circuitos de la adicción y entre ellas la Amígdala (Mansour *et al.*, 1995a, b; Cheng *et al.*, 1996; Ding *et al.*, 1996; Guan *et al.*, 1997; Chamberlin *et al.*, 1999), no ocurre lo mismo con respecto al subnúcleo CeA (Paden *et al.*, 1987; Mansour *et al.*, 1995a, b; Ding *et al.*, 1996). Esta baja correlación entre la densidad de receptores en el CeA y la marcada expresión de *c-fos* inducida por el Síndrome de Abstinencia, precipitado por antagonistas opiáceos, podría ser debida al bloqueo del control tónico inhibitorio opiáceo ejercido sobre el CeA por estructuras que sí poseen dichos receptores (Le Guen *et al.*, 2001, 2003).

Al parecer los receptores opiáceos sólo se encontrarían funcionalmente en las terminales presinápticas glutamatérgicas de las neuronas del CeA, cuya función sería limitar la liberación excesiva de Glutamato en esta zona (Zhu y Pan, 2004, 2005).

#### **4. HIPÓTESIS DE TRABAJO.**

Relacionado con lo expuesto en los párrafos anteriores de esta Introducción, el objetivo de la presente Tesis Doctoral ha consistido en examinar la implicación del PBle y del CeA, dos componentes fundamentales del eje vagal-cerebral, en los procesos adquisitivos y nutritivos a Corto Plazo.

Resultados previos habían demostrado que el PBle es esencial en el Aprendizaje Gustativo (apetitivo y aversivo) de tipo Concurrente (Mediavilla *et al.*, 2000; Zafra *et al.*, 2002; Simón *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta las conexiones viscerogustativas existentes entre este subnúcleo pontino y el CeA (Saper y Lowey, 1980; Moga *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1992; Bernard *et al.*, 1993; Jia *et al.*, 1994), cabría esperar que este último participaría también en el procesamiento de la información apetitiva y/o aversiva, esto es, que las lesiones del CeA bloquearían hipotéticamente el AA<sub>v</sub>G Concurrente.

En su caso, este experimento podría aportar alternativas a la controversia existente sobre la implicación de los distintos subnúcleos amigdalinos en esta modalidad de aprendizaje (Lamprecht y Dudai, 2000).

Esta propuesta asume que en el CeA se debe producir una convergencia viscerogustativa y, a través de un análisis inmunohistoquímico *c-fos*, se pretende confirmar que la controvertida acción visceral resultante de la administración intragástrica de NaCl hipertónico (utilizado en el protocolo del AAvG Concurrente) es procesada a través del CeA y no por otros subnúcleos amigdalinos (por ejemplo, el BLA) tal y como indican otros autores (Michl *et al.*, 2001 vs. Gu *et al.*, 1993).

En el AAvG la relevancia y capacidad sustitutoria/compensatoria de la información olfatoria no siempre ha sido tomada en cuenta. Así, se podría anticipar que los animales Bulbectomizados (anósmicos) y con lesiones del CeA con incapacidad para integrar las claves aversivo-gusto-olfato-afectivas tendrían dificultad para adquirir esta modalidad de Aprendizaje Interoceptivo Concurrente (a Corto Plazo), algo que no sucedería en sus correspondientes controles.

Por otra parte, mientras que las lesiones de estructuras amigdalinas deberían generar importantes déficits en el establecimiento de las asociaciones viscerosensoriales, la activación del CeA mediante Estimulación Eléctrica Intracerebral, por el contrario, debería inducir conductas de índole recompensante o aversiva, al igual que sucede con la Estimulación Eléctrica del PBle que induce preferencias o aversiones que pueden ser asociadas a los estímulos del entorno asociados a dicha estimulación (Simón *et al.*, 2007; Hurtado, Tesis Doctoral, 2011). Sin embargo, teniendo en cuenta las diferentes características neuroquímicas (opiáceas) del PBle y el CeA, sería previsible que si bien los efectos apetitivos o aversivos inducidos por la Estimulación Eléctrica del PBle pueden ser bloqueados mediante la administración de un antagonista opiáceo (Naloxona) (Simón *et al.*, 2007; Hurtado, Tesis Doctoral, 2011), es probable que los efectos recompensantes o aversivos (en tareas de Condicionamiento hacia un Lugar) inducidos en el CeA no estén mediados por este sistema neuroquímico.

Esta Tesis Doctoral estudiará también la relevancia del eje Vagal-PBle-CeA en los procesos nutritivos a Corto Plazo. En este sentido, numerosas investigaciones han demostrado la esencial relevancia del Nervio Vago en la ingesta de alimentos a Corto Plazo (Snowdon, 1970; Mordes *et al.*, 1979; González y Deutsch, 1981; Smith *et al.*, 1981; Davis *et al.*, 1994; Phillips y Powley, 1998; Furness *et al.*, 2001; Date *et al.*, 2002; Zafra *et al.*, 2003, 2004). Tanto el PBle como la Amígdala pertenecen a ese eje anatómico y parecen actuar como diana cerebral de las aferencias viscerosensoriales (Hermann y Rogers, 1985; Baird *et al.*, 2001a, b; Karimnamazi *et al.*, 2002). Ahora, en

la presente investigación se examinará la implicación específica de cada uno de los componentes del eje Vagal-PBle-CeA en los procesos de Saciación. De esta manera, se podría anticipar que las lesiones tanto del Vago (animales Capsaicinados), como del PBle o del CeA (concretamente del CeL) deberían producir comportamientos hiperfágicos al formar parte del mismo eje neuroanatómico implicado en la Saciación.

Asimismo, se examinará la implicación del PBle en los procesos de Saciación y re-ingesta llevados a cabo después de las extracciones parciales de contenidos gástricos en animales previamente alimentados. Teniendo en cuenta las características funcionales del Nervio Vago y sus proyecciones, en este experimento se podría hipotetizar que las lesiones del PBle deberían deteriorar la normal ingesta compensatoria, esto es, la re-ingesta que previsiblemente provoca la extracción de nutrientes desde el estómago (Snowdon, 1970; Davis y Campbell, 1973).

También con respecto al estudio de las características funcionales del eje Vagal-PBle-CeA en los procesos nutritivos a Corto Plazo se examinará sus bases neurobiológicas y concretamente la implicación del Sistema Opiáceo en dicho proceso. Diversos autores han relacionado al Sistema Opiáceo con la modulación de la nutrición (Stapleton *et al.*, 1979; Kirkham y Blundell, 1986; Carr *et al.*, 1991; Higgs y Cooper, 1997; Glass *et al.*, 1999b; Zhang y Kelley, 2000; Richardson *et al.*, 2005). Se han identificado múltiples receptores opiáceos en el PBle (Lynch *et al.*, 1985; Mansour *et al.*, 1988, 1995b; Ding *et al.*, 1996), mientras que su presencia en el CeA es motivo de variadas interpretaciones (LeGuen *et al.*, 2001, 2003). En esta Tesis Doctoral se examinará la implicación de cada uno de estos núcleos cerebrales en relación con la acción anoréxica del antagonista opiáceo Naloxona (Lynch y Libby, 1983; Kirkham y Cooper, 1988a, b; Cleary *et al.*, 1996; Giraudo *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1999). De acuerdo con los datos anteriores, se considera que las lesiones del PBI (y concretamente del PBle) o del CeA (concretamente del CeL) deberían atenuar la acción anoréxica de la Naloxona particularmente por el hecho de que estos dos componentes del eje anatómico están implicados en los procesos de Saciación mediados por el Sistema Opiáceo.

Para finalizar, en la presente Tesis Doctoral se pretende llevar a cabo un estudio farmacológico sobre la relevancia del Sistema Opiáceo en el AAvg Concurrente. En este ámbito existe una marcada controversia sobre la función de este sistema neuroquímico en los procesos adquisitivos y retentivos (Yu *et al.*, 1999; Azzara *et al.*,

2000; Delameter *et al.*, 2000; Manzanedo *et al.*, 2001b; Frisina y Sclafani, 2002; Levine *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2004).

Existen estudios neuroquímicos que sugieren que la administración de Naloxona reduce la activación del PBLé tras la inyección de un producto nocivo (Buller *et al.*, 2005). En el contexto de esta Tesis Doctoral se podría hipotetizar que este antagonista opiáceo debería interrumpir también la adquisición del AAvG Concurrente al inhibir un subnúcleo pontino crítico en esta modalidad de aprendizaje (Mediavilla *et al.*, 2000; Simón *et al.*, 2007). Sin embargo, teniendo en cuenta que el sustrato cerebral responsable del aprendizaje no siempre coincide con la región anatómica en la que la información se almacena (Lalonde y Botez, 1990; Lavond *et al.*, 1993; Bloedel y Bracha, 1995; Mediavilla *et al.*, 2000), es probable que la Naloxona no afecte a la memoria de los animales que previamente habían desarrollado el AAvG Concurrente.

Asimismo, dado que las dos modalidades de AAvG (Concurrente y Secuencial) utilizan sistemas neurales funcional y neuroquímicamente diferentes (Arnedo *et al.*, 1990, 1991; Gallo *et al.*, 1992; Garcia, 1990; Agüero *et al.*, 1993a, b; Agüero *et al.*, 1997; Mediavilla *et al.*, 1998, 1999, 2001, 2005) y que el Sistema Opiáceo está implicado en una modalidad de aprendizaje y no en la otra, se podría anticipar que la administración de Naloxona presumiblemente impida la adquisición de la modalidad Concurrente pero no afecte necesariamente a la modalidad Secuencial.

En resumen, esta serie experimental pretende unirse a los estudios que tienen por objeto identificar y analizar funcional y farmacológicamente los sistemas relacionados con los procesos de refuerzo y aversión, tanto desde la perspectiva de los procesos adquisitivos (aprendizaje viscero-cerebral) como desde planteamientos regulatorios (procesos de Saciación y Nutrición a Corto Plazo).





## **ESTUDIOS EXPERIMENTALES**



## **CAPÍTULO I:**

### **IMPLICACIÓN DEL NÚCLEO CENTRAL DE LA AMÍGDALA (CEA) EN EL APRENDIZAJE INTEROCEPTIVO CONCURRENTENTE (A CORTO PLAZO) INDUCIDO MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN INTRAGÁSTRICA DE NACL HIPERTÓNICO.**



Como se ha comentado en la introducción de la presente Tesis Doctoral, el Aprendizaje Aversivo Gustativo (AAvG) consiste en una predisposición biológica para asociar un alimento o estímulo gusto-olfatorio con estímulos nocivos, generalmente de origen visceral (Lamprecht y Dudai, 2000). El estudio neuroanatómico del AAvg ha sugerido que no existe un único “centro” del AAvg, sino que hay una serie de núcleos relacionados en complejos circuitos de interconexión que constituyen la base neuroanatómica y funcional del AAvg (García *et al.*, 1968). Estos núcleos están, posiblemente, especializados en el procesamiento de aspectos concretos de este aprendizaje, repartiendo sus funciones con una doble organización, paralela y jerárquica (Mediavilla *et al.*, 2001).

El estudio del trazado anatómico de las vías sensoriales aferentes gustativa, olfatoria y visceral desvela numerosos puntos de convergencia anatómica (Ottersen, 1982; Fulwiler y Saper, 1984; Cechetto y Saper, 1987; Price, 1990) que podrían ser la base de la convergencia funcional. Estos estudios neuroanatómicos han mostrado que los centros de relevo troncoencefálicos de la información gustativa y visceral (particularmente el Complejo Parabraquial) conectan con otros centros rostrales, especialmente la Amígdala y la Corteza Insular Gustativa (CIG) (Saper y Lowey, 1980; Cechetto, 1987; Moga *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1992). Además, se ha demostrado que la información olfatoria también tiene su relevo rostral en la Amígdala (Powell *et al.*, 1965; Scalia y Winans, 1975; Ottersen, 1982; Price, 1990; Martin, 1997), por lo que este centro límbico es un buen candidato como centro de integración fundamental en el AAvg, donde parecen converger todos los componentes sensoriales necesarios (visceral, gustativo y olfatorio) para adquirir una tarea de AAvg (Bures *et al.*, 1998; Lamprecht y Dudai, 2000).

Sin embargo, los estudios de lesión de la Amígdala dentro del paradigma del AAvg muestran resultados contradictorios. Existen tres posiciones distintas: mientras algunos autores han informado de haber interrumpido por completo la adquisición del AAvg (Nachman y Ashe, 1974; Aggleton *et al.*, 1981; Yamamoto y Fujimoto, 1991; Yamamoto, 1993; Yamamoto *et al.*, 1994; Schafe *et al.*, 1998; Sakai y Yamamoto, 1999; Morris *et al.*, 1999), otros han obtenido efectos atenuadores (Fitzgerald y Burton, 1983; Gallo *et al.*, 1992) y un tercer grupo informa que dichas lesiones no han generado efecto alguno (Lasiter, 1982; Lasiter y Glanzman, 1982; Simbayi *et al.*, 1986; Simbayi, 1987; Dunn y Everitt, 1988; Bermudez-Rattoni y McGaugh, 1991; Schafe *et al.*, 1998).

La gran variedad de datos inconsistentes acerca de la posible implicación de la Amígdala en el AAvG han situado a esta estructura telencefálica en una posición ambigua con respecto a este proceso adquisitivo. Existen varias razones que pueden explicar esta falta de consenso: a) posiblemente porque la extensión del daño de los distintos subnúcleos individuales de la Amígdala es ocasionalmente un parámetro ignorado; b) se han utilizado gran variedad de protocolos de AAvG; c) existe también un gran espectro de sabores y de agentes que inducen malestar visceral; y d) se han seguido diferentes métodos para estudiar el papel de la Amígdala en el AAvG (Lamprecht y Dudai, 2000).

De esta manera, el objetivo del presente Capítulo será intentar controlar todos estos aspectos y analizar el papel concreto del CeA en una tarea de AAvG Concurrente (a Corto Plazo) en la cual se asocia un estímulo gusto-olfatorio (Fresa o Coco) con la administración intragástrica de NaCl hipertónico.

## **EXPERIMENTO 1: Activación Inmunohistoquímica (*c-fos*) del Núcleo Central de la Amígdala (CeA) tras la administración intragástrica de NaCl Hipertónico.**

Para inducir Aprendizaje Aversivo Gustativo (AAvG) se han utilizado diversos agentes nocivos, estímulos que habitualmente producen malestar visceral o sensaciones generalizadas de enfermedad. Una de las sustancias aversivas utilizadas por este laboratorio y otros (Arnedo *et al.*, 1993; Mediavilla *et al.*, 2000, 2001; Michl *et al.*, 2001) ha sido el NaCl hipertónico (0.5M). Se trata de un producto que puede ser detectado rápidamente a su llegada al organismo a través de quimiorreceptores ampliamente distribuidos por todo el organismo dado su alto valor biológico (Blackshaw y Grundy, 1989). El NaCl hipertónico se ha mostrado como un estímulo aversivo adecuado dentro del modelo de AAvg Concurrente (a Corto Plazo) y utiliza al parecer la vía vagal-cerebral (Arnedo y Puerto, 1986; Arnedo *et al.*, 1990, 1991; Arnedo *et al.*, 1993), un eje que transmite la información sensorial visceral desde la periferia hacia estructuras rostrales del cerebro a través de relevos secundarios en estructuras troncoencefálicas (NTSc y PBl) (Contreras *et al.*, 1980; Hyde y Miselis, 1982; Norgren y Smith, 1988; Kobashi *et al.*, 1993; Yamamoto, 1993; Yamamoto y Sawa, 2000a, b; Michl *et al.*, 2001).

Utilizando técnicas inmunohistoquímicas *c-fos*, un marcador eficaz de la actividad neural, se ha examinado las neuronas y sistemas activados en respuesta a la administración de diversos productos químicos. Este procedimiento permite identificar el sustrato biológico implicado en el procesamiento de estas sustancias en el organismo (Sagar *et al.*, 1988; Morgan y Curran, 1991; Gu *et al.*, 1993; Yamamoto, 1993; Hughes y Dragunow, 1995; Schafe y Bernstein, 1996; Frenois *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2003). En el caso del NaCl hipertónico, se han identificado inicialmente neuronas marcadas por el *c-fos* en el NTSc y en PBl después de la administración tanto intragástrica (Kobashi *et al.*, 1993; Yamamoto, 1993; Yamamoto y Sawa, 2000a, b; Michl *et al.*, 2001) como subcutánea (Rinaman *et al.*, 1997). También se produce activación neuronal en el cerebro anterior tras la administración de NaCl hipertónico (Saper y Lowey, 1980; Cechetto y Saper, 1987; Price, 1990; Turner y Herkenham, 1991; Saper, 1995). Concretamente, se ha demostrado expresión de *c-fos* en diferentes subnúcleos del Tálamo, Hipotálamo y Amígdala (Gu *et al.*, 1993; Michl *et al.*, 2001). Con respecto a esta última estructura límbica, existen discrepancias acerca de los subnúcleos amigdalinos implicados en la acción del NaCl hipertónico.



Así, mientras los primeros estudios detectaban activación de neuronas amigdalinas en el BLA tras la administración intraperitoneal (Gu *et al.*, 1993), otros localizaban el efecto de la administración intragástrica en el CeA (Michl *et al.*, 2001).

De acuerdo con estos planteamientos, el objetivo del presente experimento ha sido comprobar cuál de los subnúcleos amigdalinos sería el sustrato neural implicado en la acción del NaCl hipertónico administrado intragástricamente, un estímulo nocivo adecuado para inducir AAvG Concurrente/a Corto Plazo.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

### **SUJETOS**

Se utilizaron 10 ratas albinas, de la cepa Wistar, suministradas por el Estabulario de la Universidad de Granada y cuyos pesos, al principio del estudio, oscilaban entre los 270-320 gr. 5 animales fueron asignados, aleatoriamente, al grupo control (administración intragástrica de Suero Fisiológico Isotónico) y 5 con tratamiento de NaCl hipertónico.

A su llegada al laboratorio los animales fueron alojados individualmente en jaulas de metacrilato de 15x30x15 cm. El suelo está constituido por una bandeja de metacrilato blanco cubierta por una fina capa de serrín mientras que el techo utiliza una rejilla metálica. Las paredes laterales de estas aulas son opacas, mientras las paredes frontales y posteriores son transparentes. En la pared frontal existen 2 orificios de 1.6 cm. de diámetro situados a igual distancia del centro y de los extremos, y a igual altura del suelo de la jaula, que servirán para introducir las boquillas de las buretas cilíndricas de cristal graduado que contienen el agua o estímulos gusto-olfatorios ofrecidos a los animales (Fotografía 1.1).



**Fotografía 1.1:** Procedimiento Experimental del Paradigma de AAVG Concurrente (a Corto Plazo) con bomba de administración intragástrica simultánea.

Los animales fueron mantenidos en el laboratorio de Psicobiología de la Universidad de Granada con temperatura comprendida entre 22°-25°, con ciclos de luz-oscuridad de 12-12 h. (las luces se encendían de 8 a.m. a 8 p.m.). Los animales disponían en todo momento de libre acceso a agua y comida.

## **PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO: IMPLANTE DE DOS CATÉTERES INTRAGÁSTRICOS**

Una vez anestesiados los animales con Pentotal Sódico (50mgs/Kg.; Tiopental sódico, ABBOTT Laboratories, Madrid), se practica una incisión de aproximadamente 3 cm. de longitud a lo largo de la línea media de la pared abdominal.

Localizado el estómago, se exterioriza con cuidado fuera de la cavidad abdominal. A través de una pequeña sección (2mm.) en la superficie ventral de la zona del cardias del estómago, se introduce el extremo de una fístula (1mm/2mm) que

incorpora un pequeño abultamiento realizado con adhesivo quirúrgico (Solyplast, Barcelona) y que impide que se desprenda del estómago una vez que la incisión se cierra alrededor de ella. Por mejor seguridad, se implanta una segunda fístula de forma análoga y a través de una incisión contigua a la anterior. Una vez que las dos fístulas han sido firmemente aseguradas dentro del estómago, éste es situado nuevamente en el interior de la cavidad abdominal en la posición original.

Durante todo el tiempo de la intervención quirúrgica periférica y mientras el estómago permanece fuera de la cavidad abdominal, se le mantiene constantemente irrigado con NaCl Isotónico (Grifols. Lab. Grifols, Barcelona).

Posteriormente, y a través de una pequeña abertura dorsal (inmediatamente detrás de la cabeza), se realizan dos túneles subcutáneos (uno a cada lado del animal) por el que se exteriorizan los extremos libres de los catéteres, alrededor de los cuales se crea un nuevo abultamiento de adhesivo quirúrgico, dándose posteriormente los puntos de sutura necesarios para permitir cerrar la herida. Finalmente, las paredes abdominales se cierran mediante la aplicación de los puntos de sutura.

Como profilaxis para evitar posibles infecciones, tanto los animales experimentales como los controles, recibieron una dosis de 0.1 cc. de una solución de penicilina (Penilevel Retard. Lab., Level, S.A., Barcelona) con una concentración de 250.000 U.I./ml.

Concluido el procedimiento quirúrgico, los animales son devueltos a sus jaulas, con comida y agua *ad libitum*, permitiéndoles un período de recuperación de al menos 8 días.

## **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### a) Administración intragástrica de NaCl hipertónico:

Una vez finalizado el período de recuperación (8 días post-operatorios), 5 animales de los animales reciben la administración intragástrica (a través de las fístulas) de un volumen de 5 ml de NaCl hipertónico. Por su parte, a los 5 animales del grupo control se les administra el mismo volumen de Suero Fisiológico Isotónico (SFI).

Dos horas después de la administración intragástrica (se seleccionó este período de tiempo porque el pico de la proteína Fos, cuando se estimula su expresión,

aparece entre 1-2 horas después, Morgan y Curran, 1991), todos los animales fueron profundamente anestesiados con Tiopental sódico administrado intraperitonealmente (80 mg/Kg) y perfundidos intracardiácamente con 300 ml. de tampón fosfato salino (PBS) e igual cantidad de paraformaldehído (4% en PBS). La perfusión se llevó a cabo mediante una bomba de perfusión con ajuste de velocidad (Minipuls, Gilson, USA).

Finalizada la perfusión, los cerebros fueron extraídos y postfijados durante 24 horas en paraformaldehído diluido.

#### b) Procedimiento de Inmunomarcaje de Fos.

Los cerebros fueron aclarados en PBS para eliminar los restos de paraformol y a continuación se laminaron en secciones de 50 micras a lo largo de un bloque de tejido comprendido entre las coordenadas 7.60 y la 5.40 con respecto a la línea interaural (Paxinos y Watson, 1986). Las secciones fueron llevadas a cabo mediante un vibrotomo (752M Vibroslice, Campden Instruments) y fueron conservadas en PBS.

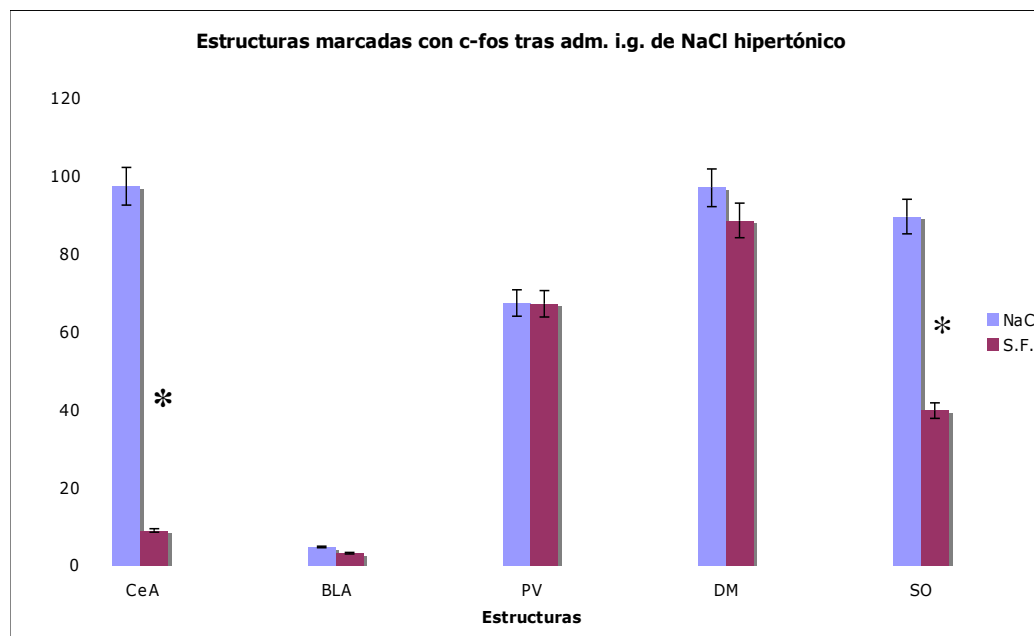
Estas secciones fueron aclaradas en PBS, preincubadas durante 20 minutos en una mezcla de metanol absoluto y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% con el propósito de inhibir las Peroxidasas endógenas e incubadas durante una hora en una mezcla de gelatina al 1% y 'normal goat serum' (Suero Normal de Calera) al 3%, diluidos en PBS. Después se transfirieron a una solución que contenía el primer anticuerpo disuelto en PBS a una concentración de 0,005 gr./ml. ('Polyclonal Rabbit IgG antibody', 1:20.000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California), el cual es capaz de reconocer los fragmentos 3-16 de la proteína Fos. Transcurridas 48 horas de incubación a una temperatura de 4°C, las secciones fueron lavadas y procesadas utilizando el método ABC (Vector Laboratories, Burlingame, California). Las secciones eran transferidas a una solución que contenía el segundo anticuerpo 'Biotinylated Goat Antirabbit' e incubadas durante una hora, para ser aclaradas posteriormente y sometidas a un proceso de revelado mediante Diaminobenzidina intensificada con Sulfato de Níquel, que produjo un marcaje de color marrón oscuro/ negro para los núcleos que mostraron inmunorreactividad al *c-fos*.

Finalizado el proceso, todas las secciones fueron mantenidas durante un tiempo mínimo de 24 horas en PBS hasta su posterior montaje en portaobjetos no

gelatinizados. Por último, los portas se cubrían con cubreobjetos utilizando DPX (DPX Mountant for Histology. Fluka. Sigma).

## RESULTADOS

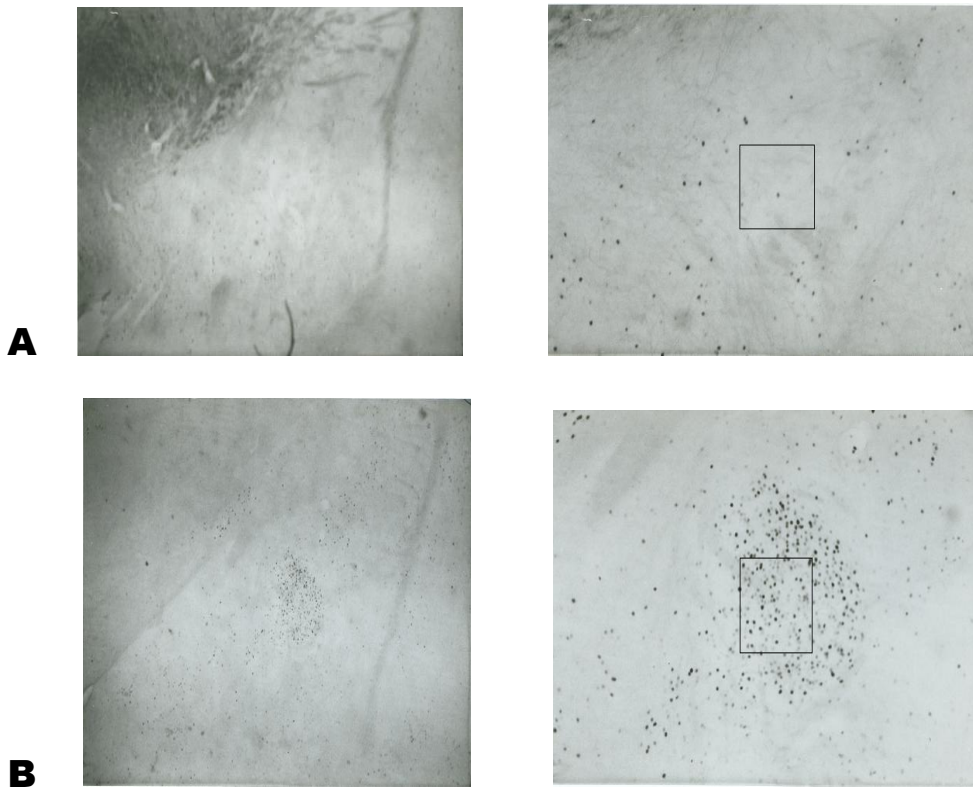
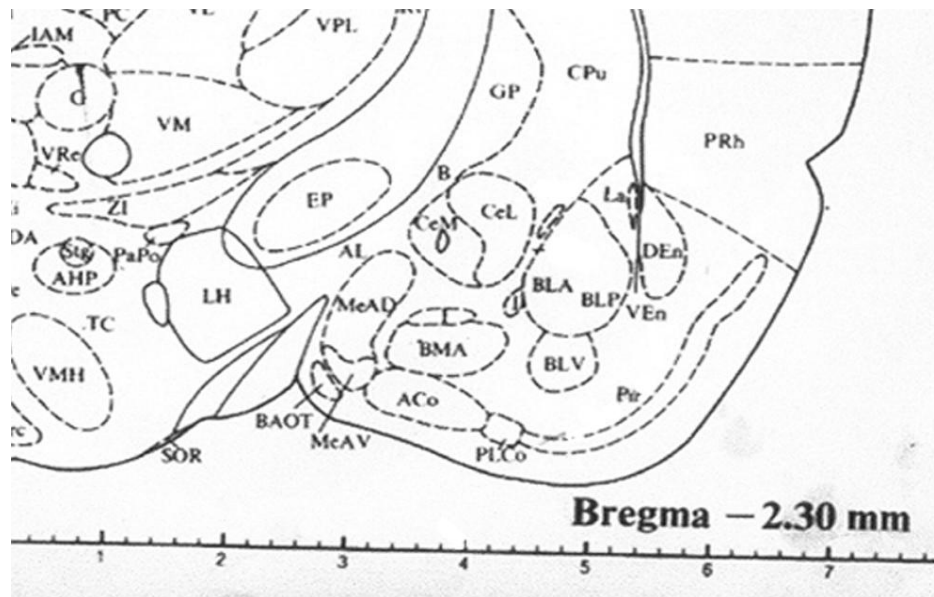
Los resultados obtenidos aparecen representados en la Gráfica 1.1:



**Gráfica 1.1:** Media de células marcadas con el procedimiento inmunohistoquímico *c-fos* en el Experimento 1. *CeA*: Núcleo Central de la Amígdala; *BLA*: Núcleo Basolateral de la Amígdala; *PV*: Núcleo Paraventricular del Tálamo; *DM*: Núcleo Dorsomedial del Tálamo; *SO*: Núcleo Supraóptico del Hipotálamo.

Para evaluar la inmunoreactividad a Fos, las preparaciones fueron examinadas mediante un microscopio óptico (Olympus, CO 11) conectado a una videocámara (TK-C1381, Olympus, U-PMTVC) y a un ordenador con software analizador de imágenes (Adobe Acrobat 5.0). Este análisis permitió observar la expresión de *c-fos* en el Núcleo Paraventricular del Tálamo (PV), Núcleo Hipotalámico Dorsomedial (DM), Núcleo Supraóptico Hipotalámico (SO) y Núcleo Central de la Amígdala (CeA), sin que apareciera activación en el Núcleo Basolateral de la Amígdala (BLA).

Para el análisis cuantitativo, se seleccionaron las secciones de cada cerebro que mostraban mayor nivel de inmunoreactividad a Fos. Como área de referencia, se usó un campo cuadrado de 2 centímetros de lado sobre la imagen capturada (con un aumento de 40X) y se cuantificaron las neuronas inmunoreactivas contenidas en dicho cuadrado (Fotografía 1.2A y 1.2B).



**Fotografía 1.2:** **A)** Muestra de la expresión de *c-fos* en el CeA tras la administración intragástrica de Suero Fisiológico Isotónico (Grupo Control). **B)** Muestra de la expresión de *c-fos* en el CeA tras la administración intragástrica de NaCl Hiper. (Grupo con NaCl hipertónico).

El número de células marcadas con *c-fos* se trató estadísticamente mediante un ANOVA, observándose que la respuesta a la administración intragástrica de NaCl hipertónico fue estadísticamente significativa sólo en el CeA [ $F(1,8) = 380.08$ ,

$p < 0.001$ ] y en SO [ $F(1,8) = 93.94$ ,  $p < 0.001$ ]. Sin embargo, no hubo diferencias en la cantidad de expresión *c-fos* entre el grupo experimental y el control ni en BL [ $F(1,8) = 1.85$ ,  $p < 0.21$ ], ni en PV [ $F(1,8) = 0.001$ ,  $p < 0.98$ ], ni en DM [ $F(1,8) = 1.48$ ,  $p < 0.25$ ], marcaje que puede ser interpretado como el resultado de factores aleatorios asumidos al efecto de la administración del NaCl hipertónico (Fotografía 1.2A y 1.2B).

## DISCUSIÓN

En este primer estudio se muestra que, dentro del complejo amigdalino, el CeA aparece como el único núcleo activado después de la administración i.g. de NaCl hipertónico, sin que se produzca activación en ninguno de los otros subnúcleos de esta región límbica.

Este experimento confirma así mismo la utilidad de la técnica con *c-fos* para identificar las zonas cerebrales implicadas en el procesamiento sensorial central, en este caso de estímulos químicos nocivos administrados periféricamente (en este caso intragástricamente) (Hughes y Dragunow, 1995). En este caso se ha permitido la localización de los núcleos cerebrales activados por una señal aferente procedente del sistema gástrico que ha sido procesada centralmente (Michl *et al.*, 2001).

Estudios previos habían mostrado que el NaCl hipertónico produce expresión de *c-fos* en diversas estructuras cerebrales (Carlson *et al.*, 1997; Carlson *et al.*, 1998; Michl *et al.*, 2001) y entre ellas el CeA, un sustrato neurobiológico amigdalino que podría estar relacionado con la acción aversiva del NaCl hipertónico (Michl *et al.*, 2001), pero no en el Núcleo Basolateral (BLA) como habían propuesto algunos otros autores (Gu *et al.*, 1993).

Otros estudios inmunohistoquímicos previos habían mostrado también la activación específica del CeA tras la administración de otros agentes aversivos y/o estresantes como, por ejemplo, LiCl (Bernard *et al.*, 1993) o el HCl (Yamamoto *et al.*, 1992; Michl *et al.*, 2001).

Aún más, un estudio llevado a cabo por Nakagawa y colaboradores (Nakagawa *et al.*, 2003) examina la implicación de los distintos subnúcleos amigdalinos en el procesamiento de varios estímulos nocivos, llegando a la conclusión de que el BLA es el relevante para el procesamiento de los estímulos químicos nocivos somáticos (Formalín administrado en la planta de la pata) mientras que el CeA lo es para los estímulos químicos nocivos viscerales (Ácido Acético administrado

intraperitonealmente), como es el caso del NaCl hipertónico administrado intragástricamente utilizado en el presente experimento.

Una explicación de por qué se había activado el BLA (y no el CeA) tras la administración del NaCl hipertónico podría encontrarse en la vía de administración utilizada, que en el estudio de Gu *et al.* (1993) fue intraperitoneal, facilitando así (probablemente) la participación de rutas no neurales (por ejemplo, Sistema Circulatorio). Sin embargo, en el presente experimento (y tras un intervalo de 2 horas) el producto nocivo ha podido acceder al Sistema Circulatorio Humoral y consecuentemente podría haber activado tanto a las estructuras cerebrales relacionadas con una ruta neurobiológica como con la otra. Pero éste no ha sido el caso y esta cuestión queda abierta para futuras investigaciones.

No obstante, las fotografías que aparecen en la investigación de Gu *et al.* (1993) no permiten delimitar entre los distintos subnúcleos amigdalinos activados tras la administración de NaCl hipertónico, por lo que otra explicación alternativa a los datos contradictorios podría ser una escasa especificación neuroanatómica de esta estructura límbica.

En efecto, los resultados de la presente investigación son consistentes con los obtenidos por Michl y colaboradores (Michl *et al.*, 2001), que además de mostrar expresión de *c-fos* en los núcleos talámicos (PV y DM) e hipotalámicos (SO), mostraron células marcadas en el CeA, tras la administración intragástrica de NaCl hipertónico. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo NaCl hipertónico con respecto al PV y DM y que fueron atribuidos a factores inespecíficos relacionados con la administración intragástrica realizada (Dragunow y Faull, 1989; Sharp *et al.*, 1991; Hughes y Dragunow, 1995). Entre ellos, por ejemplo, la manipulación y las inyecciones que se les aplica a los animales, estados de estrés que producen expresión de *c-fos* en algunas regiones cerebrales (Sharp *et al.*, 1991).

Otro autores, por su parte, han mostrado como tanto la privación de agua como el NaCl hipertónico incrementa la expresión de *c-fos* en PV y en SO, dos componentes del Sistema Neuroendocrino Hipotálamo-Neurohipofisario que están implicados en la regulación hidromineral (Carter y Murphy, 1990). Esto explicaría aparentemente las diferencias estadísticamente significativas encontradas en el SO entre los dos grupos del presente experimento.



En resumen, este primer experimento demuestra que la información procedente de la administración de agentes nocivos aplicados sobre la mucosa gástrica del estómago alcanzaría el CeA, una región teóricamente implicada en el procesamiento emocional y conductual de la información.

## **EXPERIMENTO 2: Efecto de las lesiones en el Núcleo Central de la Amígdala (CeA) sobre el Aprendizaje Interoceptivo Concurrente: Relevancia de la Información Olfatoria.**

Diversos estudios anatómicos han demostrado que los centros de relevo troncoencefálicos relacionados con la información gustativa y visceral (particularmente el Complejo Parabraquial) proyectan a diversos centros rostrales, especialmente la Amígdala y la Corteza Insular Gustativa (CIG) (Saper y Lowey, 1980; Cechetto, 1987; Moga *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1992). Esta convergencia de información sensorial (visceral y gustativa) en la Amígdala hace de esta estructura límbica una buena candidata como centro de integración en el AAvG (Bures *et al.*, 1998; Lamprecht y Dudai, 2000).

Sin embargo, en el AAvG la información olfatoria no siempre ha sido tomada en cuenta como señal sensorial relevante. Por ello algunos autores sugieren (Bures *et al.*, 1998; Rollins *et al.*, 2001; Sclafani *et al.*, 2001; Capaldi *et al.*, 2004; Touzani y Sclafani, 2005) que el término AAvG debería ser sustituido en la mayoría de los casos por el de Aprendizaje Aversivo al Sabor (AAvS), entendiendo por “sabor” la suma del componente “gustativo” y “olfatorio” de un estímulo.

En este sentido se ha demostrado repetidamente que tanto el componente “gustativo” como el “olfatorio” pueden ser asociados individualmente con el malestar visceral (De Araujo *et al.*, 2003; Capaldi *et al.*, 2004).

De acuerdo con lo anterior, dentro del Aprendizaje Aversivo Interoceptivo se podrían establecer, al menos, tres tipos de modelos distintos (AAvG, AAvO y AAvS), cada uno de los cuales puede utilizar sustratos neuroanatómicos diferentes. Así, además de núcleos cerebrales que podrían considerarse “comunes” en la adquisición del Aprendizaje Interoceptivo, como sería el Complejo Parabraquial (Ivanova y Bures, 1990; Yamamoto y Fujimoto, 1991; Spector *et al.*, 1992; Reilly *et al.*, 1993; Agüero *et al.*, 1993a, b; Bechara *et al.*, 1993), existirían otros más específicos (por ejemplo, olfatorios) que también mantienen conexiones directas con la Amígdala, y concretamente con el CeA (Norgren, 1976; Saper y Lowey, 1980; Ottersen, 1982; Moga *et al.*, 1990; Jhamandas *et al.*, 1996; Sakai y Yamamoto, 1999; Sowards y Sowards, 2001).

Sin embargo, se ha sugerido que subnúcleo amigdalino más implicado en los procesos de adquisición de aversiones olfatorias es el BLA, sin que por otra parte las

lesiones de esta estructura afecten al procesamiento sensorial de la información olfatoria *per se* (Bermudez-Rattoni *et al.*, 1986; Hatfield *et al.*, 1992; Hatfield y Gallagher, 1995; Ferry *et al.*, 1995; Ferry *et al.*, 1999; Ferry y Di Scala, 2000).

Con el objetivo de discriminar entre los sistemas exteroceptivos probablemente implicados, algunos autores proponen utilizar estímulos “gustativos” (por ejemplo, Sacarina o Sacarosa) (Schafe *et al.*, 1998; Rollins *et al.*, 2001; Sclafani *et al.*, 2001; Touzani y Sclafani *et al.*, 2005), aunque existen serias dudas acerca la supuesta “pureza” sensorial. Por ello, alternativamente otros autores prefieren bloquear el sistema olfatorio mediante técnicas como la Bulbectomía Olfatoria (seccionar los Bulbos Olfatorios) o el tratamiento de la mucosa nasal con Sulfato de Zinc (reversible), dos métodos aparentemente efectivos para interrumpir la sensibilidad olfatoria (Alberts y Galef, 1971; Bell *et al.*, 1979; Kelley *et al.*, 1997).

En cualquier caso, dentro del Aprendizaje Aversivo Interoceptivo (sin distinguir entre AAvG y AAvS), las lesiones de la Amígdala ofrecen resultados contradictorios, probablemente dependiendo del tipo y tamaño de la lesión así como de los diferentes procedimientos y estímulos utilizados en cada uno de los estudios (Lamprecht y Dudai, 2000; Touzani y Sclafani, 2005). En el caso del CeA, la mayoría de estudios descartan su relevancia o son muy débiles sus efectos sobre el Aprendizaje Aversivo Interoceptivo (Kemble *et al.*, 1979; Galaverna *et al.*, 1993; Morris *et al.*, 1999). Algunos autores atribuyen sus limitados efectos a la destrucción de la vía Parabraquial-Insular que se encuentra situada dentro de los límites del CeA y no a la destrucción propiamente dicha de los cuerpos celulares de dicho núcleo (Frey *et al.*, 1997).

Una posible explicación sobre esta falta de consenso podría relacionarse con la modalidad adquisitiva habitualmente empleada en los procedimientos experimentales, a saber el AAvG Secuencial/a Largo Plazo. De hecho y a diferencia del AAvG, el AAvO sólo puede ser adquirido cuando el estímulo visceral aversivo es administrado al animal inmediatamente antes o simultáneamente a la presentación del estímulo olfatorio (García *et al.*, 1966; Rusiniak *et al.*, 1979; Ferry y DiScala, 1997), una características distintivas de la modalidad Concurrente (a Corto Plazo) del AAvG (Arnedo y Puerto, 1986; Arnedo *et al.*, 1989, 1990, 1991; Arnedo *et al.*, 1993; Mediavilla *et al.*, 1998, 1999, 2000, 2001, 2005).

Finalmente y como se mencionaba más arriba, otro posible factor que podría explicar estos resultados contradictorios es el relacionado con los sabores empleados.

La eliminación de la convergencia viscerogustativa tras la lesión bilateral del CeA no interrumpiría la convergencia viscerolfatoria a través de conexiones olfatorias directas no sólo con el CeA (Ottersen, 1982) sino principalmente con los Núcleos Amigdalinos Centromediales (Núcleo Corticales Anterior, Núcleo Cortical Posterolateral y Núcleo Medial) (Scalia y Winans, 1975; Price, 1990). Así, estos núcleos podrían compensar y utilizar la información nociva para su asociación con la modalidad sensorial olfatoria.

De acuerdo con los datos anteriores, en el presente experimento se analizará la implicación del CeA en el AAvG (vs. AAvO y AAvS) utilizando animales anósmicos mediante Bulbectomía Olfatoria (Alberts y Galef, 1971).

Además, en el presente estudio se ha examinado la participación del CeA en el AAvG, utilizando un paradigma Concurrente y un estímulo aversivo-visceral (NaCl hipertónico) que tal y como ya se ha demostrado en el Experimento 1 del presente Capítulo y en otros estudios (Michl *et al.*, 2001), actúa específicamente a través de este subnúcleo amigdalino. Además, el NaCl hipertónico es un producto nocivo efectivo para inducir aversiones gusto-olfatorias vagas (rápidas), característica distintiva de este protocolo de AAvG a Corto Plazo (Arnedo *et al.*, 1993; Mediavilla *et al.*, 2000, 2001).

De acuerdo con este planteamiento cabría esperar que los animales controles aprenderían la tarea discriminativa decantándose por el sabor no asociado al estado nocivo, mientras que los animales anósmicos con lesiones electrolíticas bilaterales del CeA podrían no adquirir dicha tarea al no poder integrar las claves aversivo-gusto-olfato-afectivas necesarias para desarrollar esta modalidad de Aprendizaje Interoceptivo Concurrente (a Corto Plazo). En otras palabras, al quedar eliminada la convergencia viscerogustativa (lesión de CeA) y bloqueada la señal olfatoria (Bulbectomía Olfatoria), el animal no dispondría de las claves sensoriales necesarias para identificar el estímulo “gustativo” que le produce malestar gastrointestinal.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

### **SUJETOS**

Se utilizaron 51 ratas albinas, de la raza Wistar, suministradas por el animalario de la Universidad de Granada y cuyos pesos, al principio del estudio, oscilaban entre 270-330 g. Estos animales fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos, destinándose 6 ratas al grupo control (INTACTO), 11 al grupo control con lesión

electrolítica bilateral de CeA (CeA), 10 al grupo control con Bulbectomía Olfatoria y con paso de electrodo (ANÓSMICO) y 10 al grupo experimental anósmico con lesión del CeA (ANÓSMICO-CeA).

A su llegada al laboratorio los animales fueron alojados individualmente y mantenidos en las condiciones descritas en el Experimento 1 de la presente Tesis Doctoral.

## **PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO**

a) Lesión electrolítica bilateral del Núcleo Central de la Amígdala (CeA):

Las lesiones del CeA se realizaron bajo anestesia total utilizando Pentotal sódico, i.p. 50mg/Kg. (Tiopental sódico, ABBOTT Laboratories, Madrid).

Una vez anestesiados, los animales fueron situados en un aparato estereotáxico (BILANEY, Mod. SAS-4100) donde se les practica una incisión longitudinal de unos 5 cm. para dejar expuesto el cráneo. Una vez retirado el tejido perióstico conjuntivo adherido al cráneo, se trepana bilateralmente la superficie produciendo 2 orificios a través de los cuales se permite la entrada del electrodo en el tejido cerebral.

A continuación se secciona la duramadre y se introduce el electrodo hasta el punto delimitado por las coordenadas estereotáxicas. Las coordenadas estereotáxicas para la lesión de CeA fueron seleccionadas en base a la referencia interaural, con el atlas de Paxinos y Watson (1986):

AP: +6.7 mm.; V: +2 mm.; L: +-4.0 mm.

A continuación se aplica una corriente eléctrica catódica, continua y constante, bilateralmente de 1.2 mA durante 20 seg., suministrada por un generador de lesiones, Mod. D.C.LM5A (Grass, USA).

La corriente se aplica a través de un electrodo monopolar, construido para el efecto, de aproximadamente 200 micras de diámetro y aislado con INSL-X en toda su extensión excepto en los 0.5 mm. distales. El circuito se cierra con un electrodo masa situado en la periferia del animal.

#### b) Bulbectomía Olfatoria:

Una vez llevada a cabo la intervención quirúrgica a nivel central y con el animal todavía anestesiado, se realiza una sección de los Bulbos Olfatorios o Bulbectomía (Van Riezen y Leonard, 1990).

Brevemente, se realizan dos pequeños orificios (2 mm. de diámetro) a cada lado de la línea media (+/- 2 mm.), a 8 mm. anterior a Bregma (Figura), a través de los cuales se introduce una pequeña espátula que seccionará los Bulbos ejerciendo una pequeña presión sobre la base interna del cráneo, procurando no causar daño al lóbulo frontal adyacente. A continuación, se taponan los orificios realizados con cera (Bone Wax) y se procede a suturar la incisión.

#### c) Implante de dos catéteres intragástricos:

Una vez realizada las dos intervenciones quirúrgicas anteriores y con el animal todavía anestesiado, se le implantan dos fístulas intragástricas siguiendo el mismo procedimiento que se describió en el Experimento 1 de la presente Tesis Doctoral.

Concluido el proceso quirúrgico, los animales son devueltos a sus jaulas, con comida y agua *ad libitum*, concediéndoseles un período de recuperación de 8 días.

## **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

Tanto en este período como en la fase experimental siguiente, se utiliza ruido blanco de fondo para amortiguar potenciales ruidos fortuitos. Además y en todos los casos, 30 minutos antes de iniciar el experimento se limpian diariamente las fístulas con agua (0.5 cc. aproximadamente) a temperatura ambiente.

a) Fase I (Pre-entrenamiento): Una vez completado el periodo de recuperación (8 días postoperatorios), los animales comienzan la Fase I (Pre-entrenamiento) del protocolo experimental. A todos los animales se les retira el agua, de manera que, a partir de entonces, sólo tienen acceso a agua durante 10 min. que es ofrecida a través de buretas graduadas. En esta fase se les habitúa a que tomen agua de dos buretas situadas a la izquierda y derecha del animal, controlando cualquier sesgo hacia las posiciones de las buretas. La secuencia en esta Fase es la que sigue: a) En el primer día se le ofrecen dos buretas con agua (izquierda y derecha); b) el segundo día se le ofrece una bureta con agua a la izquierda; y c) el tercer día se le ofrece una bureta con

agua a la derecha. En los tres días se registra la cantidad de agua que consumen durante 10 minutos.

Finalizados los 10 minutos de ingesta, las buretas son retiradas y aproximadamente 30 minutos después reciben 15 g. de alimento sólido (Alimento de Laboratorio. Dietas Panlab. Panlab S.L., Barcelona).

b) Fase II (Experimental): En la Fase II se inicia el protocolo de aprendizaje propiamente dicho destinado a que los animales desarrollen aversiones gusto-olfatorias como consecuencia de su asociación con estímulos aversivos que suelen generar malestar visceral (NaCl hipertónico).

El procedimiento general consiste, en la presentación, durante 7 minutos, de 2 buretas que contienen cada una de ellas 2 estímulos gusto-olfatorios distintos: Fresa (F) y Coco (C) (McCormick Co. INC. San Francisco. California. USA; con una concentración de 0.5 cc. por cada 100 cc. de agua).

La ingesta de uno de los sabores iba asociado a la administración intragástrica simultánea (a través de una de las dos fístulas implantadas) de NaCl hipertónico (5%, 0.85 M), mientras que el otro sabor está asociado con la administración intragástrica de Suero Fisiológico Isotónico (S.F.). Se contrabalanceó el sabor asociado al malestar para eliminar posibles efectos inespecíficos de preferencia por alguno de los dos estímulos gusto-olfatorios (Tabla 1.1).

	<b>FRESA</b>		<b>COCO</b>	
<b>ANIMALES</b>	50% NACL	S.F.		
	50% S.F.	NACL		

**Tabla 1.1:** Distribución de los animales al sabor asociado al malestar visceral en un procedimiento de AAvG Concurrente.

La tasa de administración de ambos productos (hipertónico e isotónico) era de 1 cc./cc. de líquido ingerido y se realizaba a través de una bomba, Mod. A-98 (Razel, USA) que administra la solución a una velocidad constante para evitar los efectos inespecíficos aversivos de la administración *per se* (Fotografía 1.1).

En este paradigma de AAvG a Corto Plazo se considera que cada sesión experimental es una prueba de discriminación en sí misma, ya que el animal tiene que detectar rápidamente cuál de los dos estímulos gusto-olfatorios (Fresa ó Coco) está

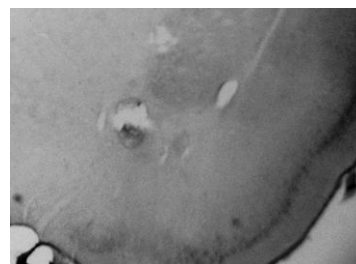
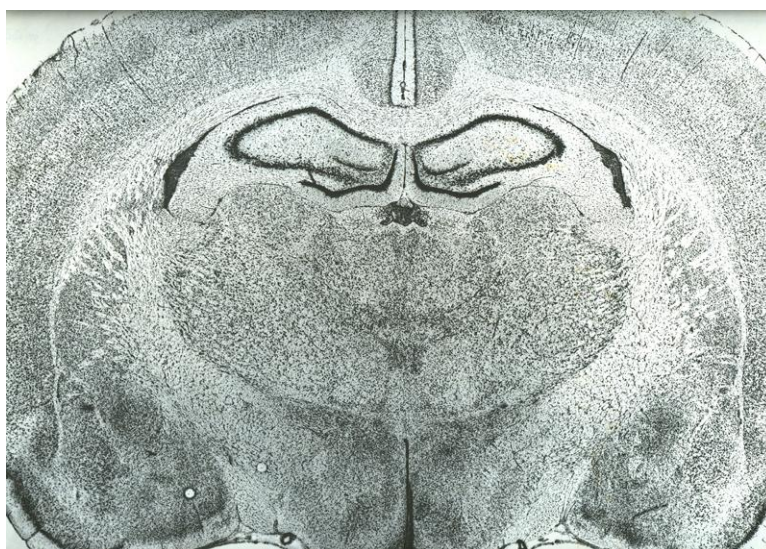
asociado con el producto aversivo (NaCl hipertónico) que le provoca la estimulación gastrointestinal y cuál con la sustancia inocua (Suero Fisiológico Isotónico).

Finalizados los 7 minutos correspondientes, se retiran las buretas y se registran las cantidades consumidas de cada estímulo gusto-olfatorio.

## HISTOLOGÍA

Al finalizar el experimento, todos los animales son profundamente anestesiados con Tiopental sódico (80 mg/Kg, ABBOTT, Madrid) y perfundidos intracardiamente con formaldehído (10%). Los cerebros se extraen y son conservados en formaldehído en una solución al 10%, al menos durante 48 horas.

Las lesiones electrolíticas fueron localizadas en secciones coronales, teñidas con Violeta de Cresilo y examinadas con un microscopio óptico (Olympus, CO 11) (Fotografía 1.3).

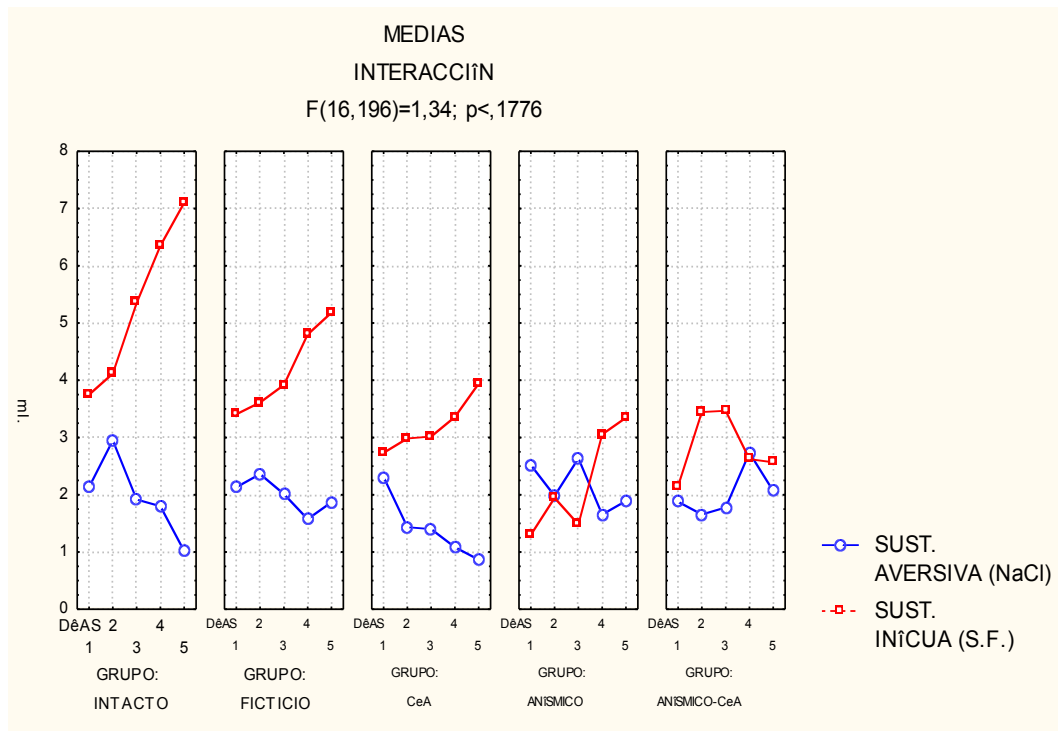


**Fotografía 1.3:** Localización anatómica de la lesión electrolítica del CeA, tomando como referencia el atlas neuroanatómico de Paxinos y Watson (1986).



## RESULTADOS

Los resultados se resumen en la Gráfica 1.2.



**Gráfica 1.2:** Media diaria de las cantidades consumidas del estímulo gusto-olfatorio asociado con NaCl hiper. y con Suero Fisiológico Isotónico en el Grupo Intacto, CeA, Anósmico y del Anósmico-CeA en el Paradigma de AAG Concurrente (a Corto Plazo).

El ANOVA realizado para determinar los efectos de la asociación demuestra que no existe efecto de interacción entre grupos [ $F(12, 152) = 1.60, p < 0.09$ ].

El análisis de los datos de los grupos Controles (Intacto, CeA, Anósmico) así como los del grupo Anósmico-CeA se analizaron utilizando un ANOVA para medidas repetidas (Droga x Días). En el Grupo Anósmico-CeA [fue estadísticamente significativo el efecto Días [ $F(4, 32) = 2.78, p < 0.04$ ]] no se produjeron diferencias en el efecto Sustancia [ $F(1, 8) = 1.23, p < 0.29$ ] ni en la interacción Días x Sustancia [ $F(4, 32) = 0.73, p < 0.57$ ], o lo que es lo mismo, los animales anósmicos con lesiones bilaterales del CeA no logran establecer asociación viscerogusto-olfatorias, en paradigmas concurrentes que utilizan NaCl hipertónico como producto nocivo.

Los restantes grupos, por su parte, aprendieron correctamente la tarea discriminativa ya que el grupo INTACTO [ $F(4, 20) = 3.63, p < 0.02$ ], CeA [ $F(4, 44) = 2.64, p < 0.04$ ] y ANÓSMICO [ $F(4, 40) = 2.75, p < 0.04$ ] mostraron diferencias significativas en la interacción Días x Sustancia, lo cual sugiere que todos los grupos

controles han desarrollado un progresivo rechazo por los estímulos gusto-olfatorios cuando éstos son asociados al NaCl hipertónico.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este experimento muestran que todos los grupos controles, excepto el grupo con Bulbectomía Olfatoria y lesión (ANÓSMICO-CeA), pueden desarrollar aversión a un sabor tras la asociación de éste con la administración intragástrica de NaCl hipertónico en un procedimiento de AAvG Concurrente (a Corto Plazo). Es posible que los animales del grupo ANÓSMICOS-CeA no aprendieran probablemente esta tarea discriminativa por carecer de índices viscerogusto-olfato-afectivos que podrían haber quedado eliminados tras la Bulbectomía Olfatoria (eliminación de las claves olfatorias) y tras la lesión de dicho subnúcleo amigdalino (eliminación de las claves viscerogusto-afectivas).

Estos datos pueden ser relevantes en el contexto de la controversia existente sobre la ausencia de efecto que se observa tras las lesiones del CeA en el paradigma del Aprendizaje Aversivo Interoceptivo.

Así, un factor determinante (en esta ausencia de efecto de las lesiones del CeA) puede ser la modalidad adquisitiva empleada para producir este aprendizaje (Lamprecht y Dudai, 2000). Como se comentó en la introducción, existen dos modalidades de Aprendizaje Interoceptivo Aversivo (Concurrente/a Corto Plazo y Secuencial/a Largo Plazo) que implicarían distintos circuitos neuroanatómicos, sustratos no redundantes para cada una de estas modalidades (García *et al.*, 1985; Kiefer, 1985; Chambers, 1990; García, 1990; Mediavilla *et al.*, 1998, 1999, 2000, 2001, 2005). En efecto, numerosos estudios han comprobado que las lesiones de BLA, y no las de CeA, interrumpen el proceso adquisitivo cuando se utiliza la modalidad Secuencial (no existen datos sobre la modalidad Concurrente) (Nachman y Ashe, 1974; Aggleton *et al.*, 1981; Yamamoto y Fujimoto, 1991; Yamamoto, 1993; Yamamoto *et al.*, 1994; Schafe *et al.*, 1998; Sakai y Yamamoto, 1999; Morris *et al.*, 1999). Los resultados del presente experimento plantean la posibilidad de que cada una de estas dos modalidades puede utilizar distintos subnúcleos amigdalinos, el BLA como región relevante en la modalidad a Largo Plazo y el CeA en la modalidad a Corto Plazo.

Acorde con esta idea, existe un estudio inmunohistoquímico en el que se mostró que la activación del CeA tras la administración intragástrica de un producto

aversivo, como es el Ácido Clorhídrico (HCl) que se sabe induce AAvG (Ervin *et al.*, 1990), era bloqueada mediante una Vagotomía (Michl *et al.*, 2001). Este resultado está en consonancia con los datos procedentes de estudios en los que se consigue bloquear una tarea de AAvG Concurrente (a Corto Plazo) mediante una Vagotomía (Rabin *et al.*, 1985; Arnedo y Puerto, 1986; Arnedo *et al.*, 1989, 1990, 1991; Arnedo *et al.*, 1993; Bechara *et al.*, 1993)

Adicionalmente, en este estudio la convergencia viscerogustativa que se produce en el CeA (Saper y Lowey, 1980; Cechetto, 1987; Moga *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1992) probablemente puede haber quedado eliminada tras la lesión, pero puede no haber afectado a la convergencia viscerolfatoria, particularmente sobre todo en los aprendizajes en los que el estímulo visceral aversivo es administrado inmediatamente antes o simultáneamente a la presentación del estímulo olfatorio (García *et al.*, 1966; Rusiniak *et al.*, 1979; Ferry y DiScala, 1997), una característica distintiva de la modalidad Concurrente utilizada en este experimento (Arnedo y Puerto, 1986; Arnedo *et al.*, 1989, 1990, 1991; Arnedo *et al.*, 1993; Mediavilla *et al.*, 1998, 1999, 2000, 2001, 2005).

En este sentido, Sclafani y asociados han propuesto que la Amígdala utilizaría sólo estímulos olfatorios y no gustativos (Touzani y Sclafani, 2005). Sin embargo, y a diferencia del presente estudio, Touzani y Sclafani (2005) utiliza lesiones extensas (sin disociar entre subnúcleos amigdalinos), usa una modalidad de aprendizaje Secuencial y utiliza estímulos condicionados a los que consideran gustativos “puros”. En resumen, se trataría de dos estudios no comparables.

Aunque existen conexiones olfatorias directas entre el Bulbo Olfatorio y el CeA (Ottersen, 1982), las principales proyecciones directas son enviadas hacia los Núcleos Amigdalinos Centromediales (Núcleo Corticales Anterior, Núcleo Cortical Posterolateral y Núcleo Medial) (Scalia y Winans, 1975; Price, 1990) (Fotografía 1.3). Por lo tanto, el hecho de que sólo se produzca un efecto atenuado sobre el Aprendizaje Interoceptivo Aversivo en algunos experimentos con lesiones del CeA (Fitzgerald y Burton, 1983; Gallo *et al.*, 1992), puede ser debido a que aunque eliminada la principal clave asociativa (gustativa), queda intacta otra (olfatoria) que sería la utilizada para producir dicho aprendizaje. En este experimento, el grupo INTACTO dispondrían de dos claves sensoriales (gustativa y olfatoria), mientras que el grupo ANÓSMICO y el CeA sólo tendría acceso a una (gustativa y olfatoria, respectivamente).

Curiosamente, las Bulbectomías Olfatorias han sido utilizadas como modelo de Depresión en algunas investigaciones al respecto (Kelly *et al.*, 1997). Sin embargo, los síntomas depresivos que se producen tras las Bulbectomías Olfatorias, a saber impedimentos en evitación pasiva (Thorne *et al.*, 1973), reducción de la aversión gustativa al LiCl (Jancsar y Leonard, 1984), no impiden que el grupo ANÓSMICO pueda desarrollar aversiones al sabor asociado a malestar visceral.

En resumen, este experimento demuestra que en un paradigma de AAvG Concurrente (a Corto Plazo), utilizando claves gusto-olfatorias para adquirir esta modalidad de aprendizaje, la lesión del CeA junto con una Bulbectomía Olfatoria bloquea la adquisición de esta modalidad de aprendizaje. Estos resultados podrían ser interpretados en el sentido de que una vez eliminada la convergencia aversivo-gusto-olfato-afectiva el animal carece de los índices sensitivos (olfato) para poder adquirir esta modalidad de aprendizaje.



## **CAPÍTULO II:**

**ACCIÓN REFORZANTE DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA  
DEL NÚCLEO CENTRAL DE LA AMÍGDALA (CeA) Y DEL  
NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL EXTERNO (PBl<sub>e</sub>) EN UNA  
TAREA DE CONDICIONAMIENTO CONCURRENTES HACIA UN  
LUGAR: EFECTOS DIFERENCIALES DE LA NALOXONA, UN  
ANTAGONISTA OPIÁCEO.**



Como ya se ha comentado en la introducción de la presente Tesis Doctoral, el Condicionamiento hacia un Lugar está considerado como un procedimiento eficaz en la investigación de los sustratos neurales del aprendizaje y la memoria (Holahan, 2005), especialmente en el estudio de los mecanismos cerebrales del refuerzo y la aversión relacionados con la comida (McDonald y White, 1993; White y McDonald, 1993; Lepore y Franklin, 1996; Packard y McGaugh, 1992, 1996; McDonald y Hong, 2004), Sacarosa o Sacarina (Stefurak y Van der Kooy, 1994), interacción social/sexual (Tzschentke, 1998) o estimulación eléctrica de determinados sustratos cerebrales (Simón *et al.*, 2007). Este modelo de Condicionamiento hacia un Lugar se ha utilizado particularmente para estudiar las consecuencias afectivas de la mayoría de las drogas de abuso (Bechara y Van der Kooy, 1992a, b; Calcagnetti y Schechter, 1994, Shippenberg *et al.*, 1996; Maldonado *et al.*, 1997; Le Foll y Goldberg, 2005a, b y c).

Aunque el circuito cerebral de refuerzo ha sido relacionado con la Vía Dopaminérgica Mesocorticolímbica (Wise y Rompré, 1989; Yeomans *et al.*, 1993; Van Bockstaele y Pickel, 1995; Wise 1996, 1998; Yeomans y Baptista, 1997), bien a través de sistemas paralelos independientes para el procesamiento de señales hedónicas (Ettenberg *et al.*, 1982; Nader *et al.*, 1997; Wise, 1996) o mediante un mecanismo multisináptico de refuerzo (Wise y Rompré, 1989; Wise, 1996; Robbins y Everitt 1996; Nader *et al.*, 1997; Simón *et al.*, 2007), existe una corriente experimental que parece relacionar al Sistema Opiáceo con él tanto anatómicamente como funcionalmente (Stellar y Corbett, 1989) e interactuando con estructuras cerebrales como el Área Tegmental Ventral, el Núcleo Accumbens y la Amígdala entre otras (Koob y Bloom, 1988; Di Chiara y North, 1992; Koob *et al.*, 1993; Koob, 1999; Tassin, 1998; Shippenberg y Elmer, 1998; Hyman, 1999; Naranjo *et al.*, 2001).

Así, el Sistema Dopaminérgico ha sido implicado en el efecto reforzador producido por la acción de los opiáceos (Burkey *et al.*, 1996; Olmstead y Franklin, 1997a, b; Maldonado *et al.*, 1997; Manzanedo *et al.*, 2001a, b) que actuaría desinhibiendo a las neuronas dopaminérgicas del Área Tegmental Ventral, lo cual da como resultado la liberación de Dopamina en el Núcleo Accumbens (Wise, 1989; Wise y Bozarth, 1987), o mediante una acción directa en el Accumbens, independiente de la liberación de Dopamina en esta zona (Koob y Bloom, 1988; Di Chiara y North, 1992; Koob, 1999; Tassin, 1998; Shippenberg y Elmer, 1998; Hyman, 1999).



Así, por ejemplo, lesiones del Núcleo Accumbens reduce el CPL inducido por la administración sistémica de morfina y heroína (Spyraki *et al.*, 1983; Kelsey *et al.*, 1989), mientras que inyecciones sistémicas de antagonistas dopaminérgicos o neurotoxinas provoca el bloqueo del CPL inducido por inyecciones de opiáceos en el VTA (Phillips y LePiane, 1980, 1982), así como de la auto-administración de opiáceos directamente en VTA (Bozarth y Wise, 1981). Además, se ha observado ausencia de refuerzo opiáceo en estudios con animales transgénicos que carecen de receptores dopaminérgicos (Maldonado *et al.*, 1997).

Más aún, diversos estudios de microdiálisis *in vivo* muestran una reducción de los niveles extracelulares de Dopamina en el Núcleo Accumbens durante el típico Síndrome de Retirada Opiácea precipitada por antagonistas opiáceos (Acquas *et al.*, 1991; Crippens y Robinson, 1994; Rossetti *et al.*, 1992; Shaham *et al.*, 1996) y así, la administración de infusiones de agonistas dopaminérgicos D2 eliminan las típicas señales somáticas de retirada opiácea, mientras que los antagonistas dopaminérgicos D2 elicitán dichos síntomas físicos (Harris y Aston-Jones, 1994).

Aunque en general los agonistas de los receptores opiáceos (por ejemplo,  $\beta$ -Funaltrexamina,  $\beta$ -FNA) actúan como recompensantes de la conducta, mientras que los antagonistas de estos receptores (por ejemplo, Naloxona) suelen tener efectos aversivos (Stolerman, 1985), un estudio más pormenorizado ha permitido hacer una distinción general entre los distintos receptores en los que éstos actúan. De esta manera, mientras los agonistas de los receptores opiáceos  $\mu$  y  $\delta$  incrementan la liberación de Dopamina en la Vía Mesocorticolímbica y producen efectos recompensantes (Mucha *et al.*, 1982; Shippenberg *et al.*, 1987; Olmstead y Franklin, 1997a, b; Schechter y Calcagnetti, 1998; Contarino *et al.*, 1999; Spiteri *et al.*, 2000; Manzanedo *et al.*, 2001a, b) que pueden ser bloqueados mediante la administración de antagonistas dopaminérgicos (Acquas y Di Chiara, 1992; Rodríguez de Fonseca *et al.*, 1995), los agonistas de los receptores opiáceos  $\kappa$  producen un descenso en la liberación de Dopamina e inducen aversión hacia los estímulos asociados con su administración (Iwamoto, 1986; Mansour *et al.*, 1995a, b).

Sin embargo, estos agentes opiáceos también parecen ejercer sus efectos motivacionales independientemente de la Vía Mesocorticolímbica (ATV-NAcc), pues lesiones localizadas en el Estriado Ventral reducen la eficacia reforzante de estas sustancias auto-administradas por vía intra-venosa, pero no la elimina (Zito *et al.*, 1985). Además, los animales pueden mantener conductas de auto-administración de

opiáceos en la región CA3 del Hipocampo y en el Hipotálamo Lateral (Stevens *et al.*, 1991; Self y Nestler, 1995).

La relevancia de antagonistas opiáceos en el fenómeno de Estimulación Eléctrica Intracerebral recompensante es, sin embargo, muy controvertida (Bielajew *et al.*, 2003). Existen estudios que muestran que estos antagonistas provoca un descenso significativo en la conducta de Auto-Estimulación Eléctrica Intracerebral (AEEIC) (Stein y Belluzzi, 1978; Schaefer y Michael, 1981, 1985, 1988; Schaefer, 1988; Trujillo *et al.*, 1989a, b; Bielajew *et al.*, 2003; Easterling y Holtzman, 2004), mientras que otras investigaciones no observan dicha supresión (Espósito *et al.*, 1980, 1981; Perry *et al.*, 1981; Freedman y Pangborn, 1984; Trujillo *et al.*, 1989a, b). Por el contrario, los antagonistas opiáceos no selectivo, como es la Naloxona, inhibe el CPL inducido por morfina (Mucha *et al.*, 1982; Del Pozo *et al.*, 1996; Shippenberg y Elmer, 1998; Manzanedo *et al.*, 2001a, b), reduce la preferencia por soluciones apetitivas (por ejemplo, Sacarosa) (Le Magnen *et al.*, 1980; Levine *et al.*, 1982; Shide y Blass, 1991; Le Magnen, 1992; Agmo *et al.*, 1995) y bloquea el CPL inducido por la Estimulación Eléctrica del PLe (Simón *et al.*, 2007). Más aún, el efecto de CPL inducido por comida puede ser bloqueado tanto por la administración de antagonistas de los receptores opiáceos (por ejemplo, Naloxona) como de los dopaminérgicos (por ejemplo, Flupentixol) (Agmo *et al.*, 1995; Tzschentke, 1998), confirmando la interacción de ambos sistemas neuroquímicos en estos procesos de recompensa cerebral.

Por otra parte, los antagonistas opiáceos pueden inducir Condicionamiento Aversivo hacia un Lugar (CAL) (Mucha *et al.*, 1982; Stinus *et al.*, 1990; Maldonado *et al.*, 1992; Del Pozo *et al.*, 1996; Shippenberg y Elmer, 1998; Manzanedo *et al.*, 2001a, b), y así de acuerdo con ello, tras la administración crónica de las drogas de abuso (por ejemplo, morfina, cocaína, alcohol, etc.) provocan manifestaciones de dependencia física con la aparición de síntomas somáticos y motivacionales (Jaffe *et al.*, 1990). Este Síndrome de Retirada (SR) ha sido relacionado específicamente con la división Central de la Amígdala (CexA) (Calvino *et al.*, 1979; Stinus *et al.*, 1990; Rassnick *et al.*, 1993; Stornetta *et al.*, 1993; Pich *et al.*, 1995; Kelsey y Arnold, 1994; Rodríguez de Fonseca *et al.*, 1997; Koob, 1999; Lu *et al.*, 2000; Gracy *et al.*, 2001; Koob y Le Moal, 2001; Le Guen *et al.*, 2001, 2003; Frenois *et al.*, 2002; Zarrindast *et al.*, 2002b; Veinante *et al.*, 2003; Nakagawa *et al.*, 2005). Esta región, que incluye a subnúcleos como el CeA y la parte lateral del Núcleo Lecho de la Estría Terminalis (NLETI) (Alheid *et al.*, 1995), ha sido considerada por algunos autores como el

sustrato neural que induciría o, al menos, modularía los síntomas motores y motivacionales del SR (Calvino *et al.*, 1979; Aston-Jones *et al.*, 1999; Delfs *et al.*, 2000; Gracy *et al.*, 2001; Frenois *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2002a, b; Veinante *et al.*, 2003).

El examen de los distintos antagonistas selectivos de los receptores opiáceos  $\mu$  ( $\beta$ -Funaltrexamina,  $\beta$ FNA) (Ward *et al.*, 1982; Hayes *et al.*, 1986),  $\delta$  (Naltrindol, NTI) (Drower *et al.*, 1991; Verborgh y Meert, 1999; Stevenson *et al.*, 2000) y  $\kappa$  (Nor-Binaltorfimina, BNI) (Takemori y Portoghese, 1987) ha permitido demostrar la relevancia de los receptores opiáceos  $\mu$  en los cambios conductuales y de expresión *c-fos* típicos del SR desarrollados por los animales morfíno-dependientes (Le Guen *et al.*, 2003). Esta primacía de los receptores  $\mu$  en el SR de morfina viene apoyada también por estudios que utilizan roedores transgénicos y en los que se comprueba que sólo aquellos animales que carecían de los receptores opiáceos  $\mu$  no desarrollaban el SR (Childers, 1997; Valverde y Roques, 1998; Sora *et al.*, 2001; Kieffer y Gavériaux-Ruff, 2002).

Además, y en esta misma línea, se ha observado que cuando se administran bajas dosis de Naloxona a animales morfíno-dependientes (7.5-30 $\mu$ g/Kg.) o altas en animales intactos (*naïves*) (>2mg/Kg.) se induce Condicionamiento Aversivo hacia un Lugar (CAL) (Mucha, 1987; Stinus *et al.*, 1990; Schulteis *et al.*, 1994), Aprendizaje Aversivo Gustativo (AAvG) (Rodgers *et al.*, 1984), supresión de la actividad locomotora (Brady y Holtzman, 1981) y de la respuesta operante para obtener comida (Gellert y Sparber, 1977; Higgins y Sellers, 1994; Koob *et al.*, 1989), así como un incremento de los umbrales de AEEIC (Schaefer y Michael, 1986).

De acuerdo con este planteamiento, el objetivo de este Capítulo ha sido examinar en primer lugar si la Estimulación Eléctrica del CeA puede inducir preferencias/aversiones específicas hacia los estímulos del entorno con los que es asociada en un paradigma de Condicionamiento hacia un Lugar, examinado la relevancia del sistema opiáceo en este proceso. Los resultados del Experimento 3 de la presente Tesis Doctoral serán contrastados con el Experimento 4, en el que también se llevará a cabo la Estimulación Eléctrica del PBle y la implicación del sistema opiáceo, una comparación que se fundamenta en el hecho de que se trata de dos núcleos con una extensa conexión anatómica y funcional.

### **EXPERIMENTO 3: Estimulación Eléctrica Reforzante del Núcleo Central de la Amígdala (CeA): Análisis de la administración subcutánea de Naloxona en una tarea de Condicionamiento Concurrente hacia un Lugar.**

Existen diversas estructuras cerebrales que está implicadas tanto en el procesamiento de la información aversiva como apetitiva (Cubero y Puerto, 2000a; Simón *et al.*, 2007).

Así, por ejemplo, la Estimulación Eléctrica del PBle induce aversiones y preferencias consistentes tanto hacia los estímulos gusto-olfatorios como hacia los lugares con los que es asociada y que serían procesadas por el sistema neuroquímico opiáceo, ya que la Naloxona bloquea dichas preferencias (Simón *et al.*, 2007).

Dado que existen importantes conexiones recíprocas entre el PBle y la Amígdala (Norgren, 1976; Saper y Lowey, 1980; Ottersen, 1982; Bernard *et al.*, 1993; Krukoff *et al.*, 1993; Jhamandas *et al.*, 1996), y concretamente con el CeA (Fulwiler y Saper, 1984; Moga *et al.*, 1990; Bernard *et al.*, 1993; Alden *et al.*, 1994; Jia, *et al.*, 1994), cabría esperar una implicación similar en el procesamiento de la información aversiva y/o apetitiva en este subnúcleo amigdalino.

La Amígdala ha sido considerada generalmente como un sustrato cerebral fundamental en el procesamiento de la información aversiva (negativa), algo que se vio confirmado a través de los resultados del Capítulo I de la presente Tesis Doctoral así como en otros estudios que han observado la activación, entre otras, de las neuronas del CeA tras la administración de varios de los principales agentes aversivos utilizados en el AAvG, por ejemplo, el NaCl y el HCl administrados intragástricamente (Michl *et al.*, 2001); el LiCl intraperitoneal (Yamamoto *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1997) e intragástrico (Yamamoto y Sawa, 2000a); el Etanol intraperitoneal (Thiele *et al.*, 2000) e intragástrico (Yamamoto y Sawa, 2000a); la Sacarosa intragástrica (Yamamoto *et al.*, 1997; Yamamoto y Sawa, 2000a) e intraoral (Yamamoto *et al.*, 1997); y la Gastrina intravenosa (Yakabi *et al.*, 2002).

Más aún, existen estudios que han relacionado al CeA en el reforzamiento negativo asociado con la retirada de la administración crónica de opiáceos (Rassnick *et al.*, 1993; Callahan *et al.*, 1995; Pich *et al.*, 1995; Hurd *et al.*, 1997; Rodríguez de Fonseca *et al.*, 1997; Koob, 1998, 1999; Koob y LeMoal, 2001) o con la

“precipitación” del Síndrome de Retirada (SR) a través de la administración de antagonistas opiáceos (Higgins y Sellers, 1994; Carr *et al.*, 1999; Gestreau *et al.*, 2000; Gracy *et al.*, 2001; LeGuen *et al.*, 2001, 2003; Frenois *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2005).

Por el contrario, las lesiones específicas del CeA (Kelsey y Arnold, 1994; Watanabe *et al.*, 2002b; Nakagawa *et al.*, 2005) o microinyecciones de antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos en este subnúcleo (Watanabe *et al.*, 2003) atenúan el Condicionamiento Aversivo hacia un Lugar (CAL) inducido por retirada de morfina en animales morfino-dependientes.

Sin embargo, aunque los receptores opiáceos están ampliamente expresados en todas las áreas cerebrales relacionadas con los circuitos de la adicción, entre ellas la Amígdala (Mansour *et al.*, 1995a, b; Cheng *et al.*, 1996; Ding *et al.*, 1996; Guan *et al.*, 1997; Chamberlin *et al.*, 1999), están poco representados en el CeA concretamente (Paden *et al.*, 1987; Mansour *et al.*, 1995a, b; Ding *et al.*, 1996). Esta aparente contradicción entre la baja densidad de receptores en el CeA y su significativa activación inducida por el SR precipitado por Naloxona parece ser debida al bloqueo del control tónico inhibitorio opiáceo ejercido sobre el CeA por otra estructura que sí posea dichos receptores (Le Guen *et al.*, 2001, 2003).

Por otro lado, existen investigaciones que han puesto de manifiesto el papel de la Amígdala (Everitt *et al.*, 2003; Waraczynski, 2003), y más concretamente del CeA (Zhu y Pan, 2004, 2005), en el procesamiento de la información apetitiva, y en particular con los aspectos emocionales de las drogas de abuso y la adicción (Brown y Fibiger, 1993; Rodríguez de Fonseca y Navarro, 1998; O'Dell *et al.*, 1999; Chevrette *et al.*, 2002; Holahan, 2005), con la conducta alimenticia (King *et al.*, 1994; King *et al.*, 1996; Nishijo *et al.*, 2000) o sexual (Kling y Brothers, 1992), así como con la adquisición de preferencias condicionadas a los sabores (Touzani y Sclafani, 2005) y en la modulación del aprendizaje asociativo sensorial (Gallagher y Holland, 1992; Wilensky *et al.*, 2000).

Así mismo, se ha demostrado que algunos de los subnúcleos amigdalinos, incluido el CeA, sustentan la Estimulación Eléctrica recompensante (Kane *et al.*, 1991; Panagis *et al.*, 1995; Touzani y Velley, 1998) y la Estimulación Eléctrica de las principales zonas cerebrales de refuerzo (por ejemplo, Hipotálamo Lateral) suele estar asociada con incrementos en la actividad celular de algunos subnúcleos

amigdalinos, entre ellos, el CeA (Arvanitogiannis *et al.*, 1996; Hunt y McGregor, 1998; Touzani y Velley, 1998; Nakahara *et al.*, 1999).

Por otra parte, la Amígdala estaría implicada en las propiedades reforzantes de los opiáceos (Criado y Morales, 2000; Zarrindast *et al.*, 2002b; Zhu y Pan, 2004, 2005) y en la interacción con el Sistema Mesocorticolímbico Dopaminérgico (Scibilia *et al.*, 1992; Shippenber *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 2000; Baxter y Murray, 2002; Rezayof *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 2003).

En tareas de CPL se ha demostrado que la lesión de la Amígdala bloquea el aprendizaje asociado a drogas (Hiroi y White, 1991; Zarrindast *et al.*, 2002b), a comida (Everitt *et al.*, 1991; White y McDonald, 1993; McIntyre *et al.*, 1998) y en reforzamientos condicionados (Estímulo-Refuerzo) (Jones y Mishkin, 1972; LeDoux *et al.*, 1990; Davis, 1992; White y McDonald, 2002; Everitt *et al.*, 2003).

De acuerdo con estos planteamientos, el propósito del presente Capítulo será examinar si la Estimulación Eléctrica del CeA induce preferencias/aversiones consistentes hacia los estímulos ambientales con los que es asociada en una tarea de Condicionamiento Concurrente hacia un Lugar, al igual que sucedía en los experimentos llevados a cabo por este laboratorio con la Estimulación Eléctrica del PBle (Simón *et al.*, 2007), con el cual mantiene una estrecha conexión anatómica y funcional (Norgren, 1976; Saper y Lowey, 1980; Ottersen, 1982; Bernard *et al.*, 1993; Krukoff *et al.*, 1993; Jia *et al.*, 1994; Jhamandas *et al.*, 1996). Igualmente se examinará la implicación del CeA tanto en el procesamiento aversivo (Rassnick *et al.*, 1993; Rodríguez de Fonseca *et al.*, 1997; Gestreau *et al.*, 2000; Gracy *et al.*, 2001; Le Guen *et al.*, 2001, 2003; Frenois *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2002a, b; 2003; Nakagawa *et al.*, 2005) como recompensante (Baxter y Murray, 2002; Phillips *et al.*, 2003; Zhu y Pan, 2004, 2005) después de la administración de Naloxona, un antagonista opiáceo, con tal de dilucidar la relevancia del Sistema Opiáceo en estas manifestaciones motivadas.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

### **SUJETOS**

Se emplearon 27 ratas de la raza Wistar procedentes del animalario de la Universidad de Granada, cuyos pesos al comenzar el procedimiento quirúrgico se encontraban entre 270 y 320 g. y de las cuales 20 fueron implantadas y 7 controles (intactas).

Todos los animales fueron alojados en jaulas de plexiglás de 30x30x30 cm. (de características similares a las descritas en el Capítulo I de la presente Tesis Doctoral) y mantenidos con comida y agua *ad libitum* durante una semana de habituación previa a la cirugía. Las condiciones ambientales de luz y temperatura fueron mantenidas constantes, según lo descrito en el Capítulo I. Todas las manipulaciones experimentales fueron llevadas a cabo durante el período de luz.

## **PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO**

### - Implante de un electrodo de Estimulación Eléctrica Intracerebral en el Núcleo Central de la Amígdala (CeA):

Los 20 animales sometidos a intervención quirúrgica recibieron el implante de un electrodo monopolar en el CeA utilizando las mismas coordenadas descritas en el Experimento 1 de la presente Tesis Doctoral (AP= +6.7; L= +4.0; V= +2.0), según el Atlas Estereotáxico de Paxinos y Watson (1986).

La cirugía se llevó a cabo utilizando como anestesia Pentotal Sódico (Thiopental Sódico, Laboratorios Abbot S.A., Madrid), con una dosis de 50 mg/Kg. y un equipo estereotáxico (Stoelling, Mod. 51600, U.S.A.). Se realizó un pequeño corte longitudinal de unos 2 cm. de largo, retirando posteriormente el tejido perióstico adyacente a ambos lados y raspando ligeramente el cráneo para dejarlo completamente limpio y seco. Seguidamente, se trepanaron 4 orificios en los que se insertaron 4 tornillos pequeños de acero inoxidable, alrededor de los cuales se fijó el electrodo masa o de referencia (sección de unos 5 cm. de longitud de acero inoxidable de uso odontológico, de 0.9 mm. de diámetro).

A continuación se perforó un nuevo orificio de mayor diámetro que los anteriores, a través del cual se introdujo un electrodo monopolar de 200 micras de diámetro fabricados con alfileres entomológicos de acero inoxidable (nº 00) a los que se soldaba una sección de hilo dental de unos 3 cm. de largo (igualmente de acero inoxidable) curvado en ángulo recto. Se aisló toda la longitud del electrodo con INSL-X hasta el punto de unión de ambas secciones y se cortó el extremo sobrante.

Una vez situado el electrodo activo en la zona delimitada por las coordenadas estereotáxicas, se procedió a su fijación con resina acrílica (S.R. Denture Base, Quick 3/60, Ivoclar) recubriéndolo junto con los tornillos y el electrodo masa hasta dejar el implante totalmente cubierto y fijado al cráneo. Finalizado el proceso, se retiró al animal del estereotáxico y se seccionaron los dos extremos sobrantes de los

electrodos, manteniéndolos con una longitud de 1.5 cm. aproximadamente por encima del cráneo.

Como medida preventiva ante cualquier potencial infección, todos los animales recibieron una dosis intramuscular de 0.1 cc. de penicilina (Penilevel Retard. Lab., Level, S.A., Barcelona) y se les añadió una solución antiséptica alrededor del implante (Betadine. Povidona Yodada. Asta Médica, Madrid).

Concluida la operación, los animales fueron instalados individualmente en sus jaulas habituales donde permanecieron durante al menos una semana, como periodo de recuperación, con comida y agua *ad libitum*.

## **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### a) Exploración de parámetros de Estimulación Eléctrica:

Antes de proceder a la Fase de Condicionamiento al Lugar (CL), se realizó una exploración para establecer los parámetros de la corriente eléctrica adecuados a cada animal. Para ello, dos días antes del periodo conductual, se sometió a cada animal a la estimulación eléctrica del CeA a través de un estimulador CS-20 (Cibertec, Madrid, España) conectado a una unidad de aislamiento ISU 165 (Cibertec, Madrid, España) para evitar la ionización y destrucción del tejido cerebral tras el uso continuado de dicha estimulación (Fotografía 2.1).



**Fotografía 2.1:** Estimulador CS-20 y unidad de aislamiento ISU 165 (situada sobre el estimulador).

El equipo de estimulación estaba monitorizado a través de un osciloscopio 40 MHz “HM 404-2” (HAMEG Instrument GmbH, Frankfurt, Alemania) que permitía controlar con precisión los parámetros de la estimulación (Fotografía 2.2).





**Fotografía 2.2:** Osciloscopio “HAMEG, HM 404-2”.

Se utilizó una corriente directa pulsante y una frecuencia de 66.6 Hz., mientras que la corriente empleada fue progresivamente incrementada hasta llegar a un máximo que no provocara conductas de escape, saltos o reacciones vocales. En otras palabras, “una corriente conductualmente noticiable, pero siempre por debajo del umbral aversivo” (Tehovnik, 1996). Entre cada periodo de estimulación se introdujo un período de descanso de 2 min. Así, se establece la intensidad de corriente apropiada para cada animal y que será utilizada durante toda la fase experimental. Los valores del grupo oscilaron entre 90 y 200 microamperios ( $\mu\text{A}$ .) (Media: 165.62  $\mu\text{A}$ .). Se dejó transcurrir un intervalo de 24 horas entre esta prueba y el comienzo de la Fase de Condicionamiento, durante el cual los animales dispusieron de comida y agua *ad libitum*.

b) Condicionamiento de Preferencia hacia un Lugar (CPL):

El Condicionamiento de Preferencia constaba de dos fases:

- *Primera Fase: Preferencias inducidas mediante Estimulación Eléctrica del CeA en una tarea de Condicionamiento Concurrente hacia un Lugar.*

Esta primera fase fue llevada a cabo en un Laberinto rectangular (Modelo 1) cuyas dimensiones eran 48 cm. de largo x 25 cm. de ancho y 30 cm. de altura. El recinto interior estaba dividido en dos zonas laterales diferentes en cuanto a color y textura, pero similarmente preferidas por los animales. La zona central (neutra) era más estrecha (8 x 25 cm.) y su suelo era de metacrilato blanco con paredes de color madera-natural. Los dos áreas laterales estaban forradas con un suelo de corcho

blanco pintado a rayas, en un caso, y de corcho marrón en el otro, con medida de 20 x 25 cm. cada uno. Las paredes de ambos laterales estaban forradas del papel pintado a rayas blancas y negras de 1 cm. de espesor, orientadas en sentido vertical en un lado y horizontal en el otro (Fotografía 2.3).



**Fotografía 2.3:** Laberinto Modelo 1 en forma de corredor utilizado para la Estimulación Eléctrica Intracerebral.

Cada animal fué sometido a 2 sesiones de Condicionamiento, en días consecutivos, de 10 min. de duración cada una. Esta fase de Condicionamiento incluía un Grupo Control Intacto, compuesto por 7 animales que no fueron sometidos a procedimiento quirúrgico alguno. En este período de tiempo, en el que los sujetos podían deambular libremente por el laberinto, los animales recibían Estimulación Eléctrica del CeA cuando visitaban uno de los laterales del laberinto aleatoriamente establecidos con anterioridad; o no recibían Estimulación si se desplazaban hacia el otro lateral.

Individualmente cada animal era situando en el espacio central del laberinto y registrándose el tiempo que permanecía en cada zona. Como criterio se consideraba que un animal estaba dentro de una de las zonas laterales cuando tenía la cabeza y las dos patas delanteras dentro de ese lateral. La mitad de los animales recibió Estimulación en uno de los compartimentos y la otra mitad en el otro. Finalizado el tiempo, los animales eran devueltos a sus jaulas, donde disponían de comida y agua *ad libitum*.

- Segunda Fase: *Efectos comportamentales de la administración de Naloxona en animales estimulados en el CeA.*

Cuarenta y ocho horas después, se dio comienzo a la segunda fase en la que todos los animales recibieron una inyección de Naloxona (4mg/Kg.) 20 minutos antes de situarlos en un nuevo Laberinto Modelo 2 (Fotografía 2.4), que fue utilizado

con el objetivo de evitar transferencias con el laberinto anterior. Este nuevo laberinto, también rectangular, tenía unas dimensiones de 70x15x15 cm. También en él se podían distinguir tres zonas: una zona central de 10 cm. con suelo de papel blanco cubierto por una rejilla metálica y paredes blancas, y otras dos zonas de 30 cm. cada una, con paredes de metacrilato negras y suelo de corcho marrón. Estas dos zonas laterales diferían entre sí de modo que una de ellas disponía en la pared frontal de un orificio circular, mientras que en la otra el orificio es rectangular. Además, el suelo de la primera zona mencionada presentaba incisiones horizontales mientras que la segunda las tenía en sentido vertical.

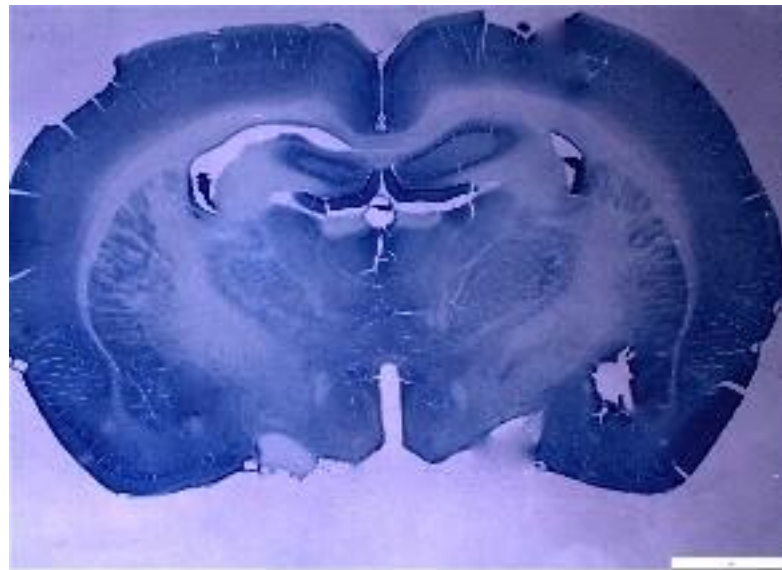
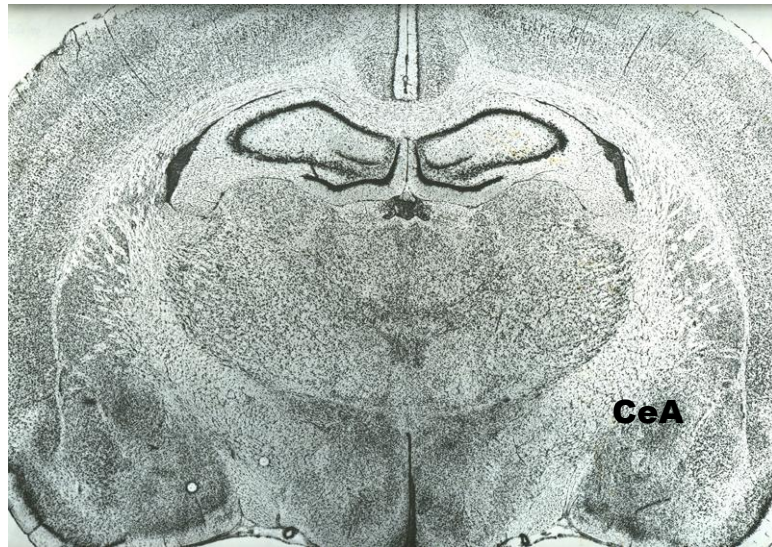


**Fotografía 2.4:** Laberinto Modelo 2 en forma de corredor utilizado para la administración subcutánea de Naloxona.

Al igual que en la fase anterior, esta segunda fase comenzaba situando a cada animal en el espacio central del laberinto y se le permitía deambular libremente por él durante los 10 min. que duraba el ensayo, registrándose el tiempo que permanecía en cada zona. De este modo, si el animal entraba en el compartimento prefijado aleatoriamente con anterioridad recibía Estimulación Eléctrica simultáneamente, mientras que si entraba en el otro compartimento no recibía estimulación.

## **HISTOLOGÍA**

Concluido el experimento, los animales fueron perfundidos transcárdialmente con 40 ml. de Suero Fisiológico y otros 40 ml. de formaldahido al 4%. Se obtuvieron secciones coronales del tejido nervioso, de 50 micras, las cuales fueron montadas y teñidas siguiendo el procedimiento descrito en el Experimento 2 de la presente Tesis Doctoral (Fotografía 2.5).



**Fotografía 2.5:** Localización del electrodo intracerebral implantado en el CeA, tomando como referencia el atlas neuroanatómico de Paxinos y Watson (1986).

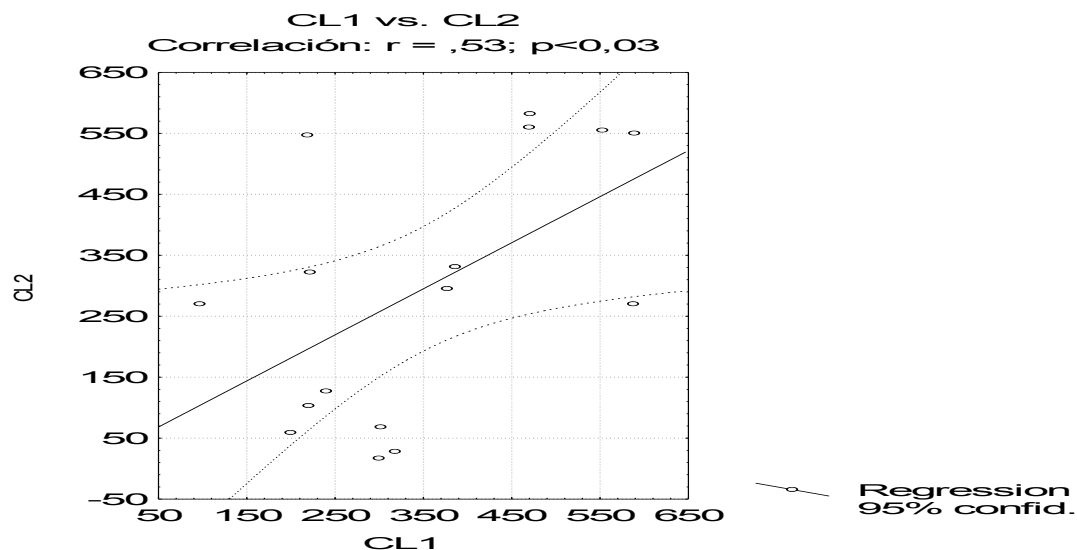
## RESULTADOS

- *Primera Fase: Preferencias inducidas mediante Estimulación Eléctrica del CeA en una tarea de Condicionamiento Concurrente hacia un Lugar.*

De los 20 animales a los que se implantó un electrodo en el CeA, 4 tuvieron que ser excluidos porque se les desprendió el implante, con lo cual quedaron 16 ratas experimentales.

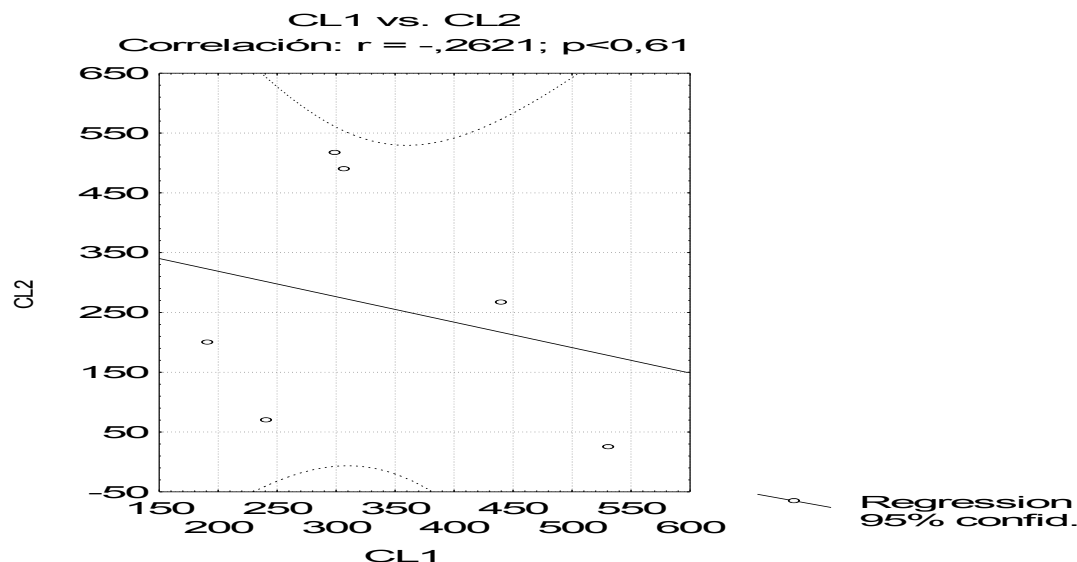
Al comparar la ejecución de los animales experimentales en las dos sesiones de condicionamiento (CL1 y CL2), se observa una correlación estadísticamente

significativa entre estos dos días ( $R= 0,53$ ;  $p<0,03$ ), lo cual significa que la conducta de preferencia o rechazo por el lugar estimulado mostrada por los animales es consistente (Gráfica 2.1).



**Gráfica 2.1:** Matriz de correlación para los sujetos del Grupo Implantado en el CeA respecto a la proporción de tiempo que permanecen en el compartimento Estimulado en cada una de las dos sesiones de condicionamiento.

Por su parte, los animales del Grupo Control ‘sin estimulación’ (Intactos), alternan entre ambos laterales del corredor ( $R=-0,03$ ;  $p<0,93$ ), sin desarrollar preferencias por uno u otro compartimento (Gráfica 2.2).



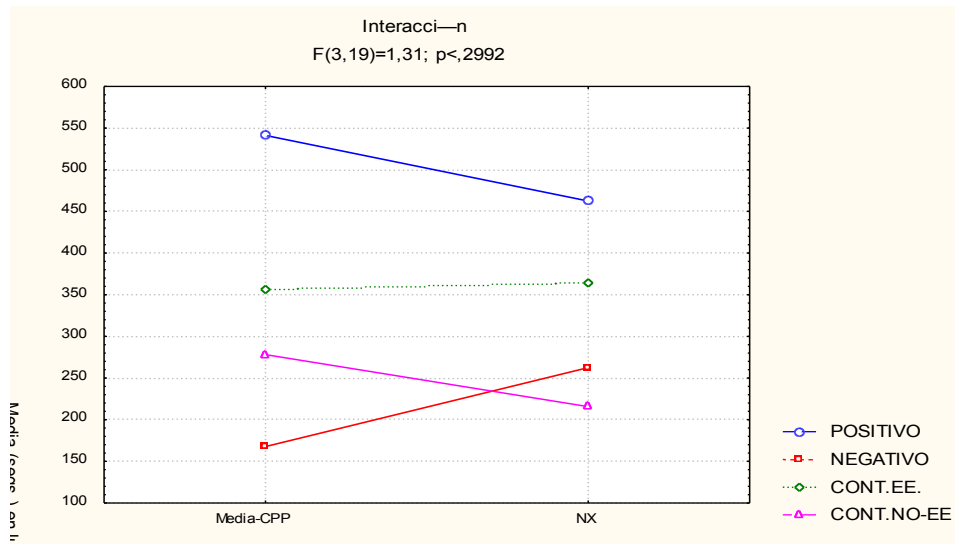
**Gráfica 2.2:** Matriz de correlación para los sujetos del Grupo Control Intacto del CeA respecto a la proporción de tiempo que permanecen en uno de los dos compartimentos, seleccionado al azar, en cada una de las dos sesiones de condicionamiento de la primera fase.

Los datos referentes a los animales que recibieron Estimulación Eléctrica en el CeA, permiten clasificarlos en tres grupos en función de su comportamiento: un grupo de animales prefiere consistentemente el lugar de la estimulación (Grupo Positivo), otro grupo de animales que no muestra una conducta definida de rechazo o preferencia (Grupo Neutro Estimulado) y finalmente otro grupo de animales que rechaza el lugar de la estimulación (Grupo Negativo). El criterio comportamental establecido para la asignación de cada animal a un grupo fue el utilizado por Simón y colaboradores (2007) y fue el siguiente: todos aquellos sujetos que en cada sesión permanecían más del 50% del tiempo total en la zona asociada a la estimulación o aquellos que permanecían la primera sesión entre el 30 y el 50% del tiempo y en la segunda más del 50% en dicha zona, pasarían a formar parte del “Grupo Positivo”. El “Grupo Negativo” estaría constituido por aquellos animales que pasaron menos del 30% del tiempo total en el compartimento estimulado en las dos sesiones de condicionamiento, o aquellos cuya estancia durante la primera sesión fuese entre el 30 y el 50% y en la segunda menos del 30% del tiempo total en esa área. Y finalmente se consideraron animales “Neutros” a aquellos que o bien un día eran “Positivos” y en la otra sesión de condicionamiento eran “Negativos”, o viceversa, o aquellos que no mostraban una preferencia consistente por ninguna de las zonas del laberinto (permanencia entre un 30 y un 50% del tiempo total en cada una de las zonas laterales del laberinto).

De acuerdo con este criterio conductual utilizado para la clasificación de los animales en los distintos grupos, se incluyeron 4 animales en el Grupo Positivo, 5 en el grupo Control Estimulado y 7 en el grupo Negativo.

*- Segunda Fase: Efectos comportamentales de la administración de Naloxona en animales estimulados en el CeA.*

El análisis estadístico llevado a cabo en esta segunda fase consistió en comparar la proporción del tiempo de permanencia de los animales en el compartimento asociado a la Estimulación Eléctrica durante los dos ensayos de condicionamiento de la primera fase y el tiempo de permanencia durante la segunda fase con Naloxona. Para este análisis de los datos se utilizó un ANOVA unifactorial intrasujeto (Gráfica 2.3).



**Gráfica 2.3:** Media del tiempo de permanencia (segs.) en el compartimento estimulando el CeA de los dos ensayos de condicionamiento de la primera fase y tras la administración de Naloxona.

Los resultados obtenidos en el ANOVA total indican que no existen diferencias significativas de la interacción entre los grupos [ $F(3, 19)=1.31$ ;  $p<0,29$ ] (Gráfica 2.3).

El ANOVA individual llevado a cabo a cada grupo indica que ninguno de los cuatro grupos muestra diferencias significativas, indicando que la Naloxona no produjo ningún efecto (Gráfica 2.3).

Un análisis descriptivo de los datos sugiere que tanto el Grupo “Positivo” como el “Negativo” muestra una moderada tendencia de la Naloxona para reducir las propiedades apetitivas y aversivas, respectivamente, de la Estimulación Eléctrica del CeA, aunque no llegan a ser estadísticamente significativo [Grupo Positivo:  $F(1, 3)=0.87$ ;  $p<0.41$ ; Grupo Negativo:  $F(1, 6)=2.15$ ;  $p<0.19$ ] (Gráfica 2.3).

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente experimento demuestran que la Estimulación Eléctrica del CeA genera consistentes conductas de preferencia (Grupo Positivo) o aversión (Grupo Negativo) hacia los estímulos del entorno con los que es asociada. En estas pruebas aparece habitualmente otro grupo de animales experimentales estimulados (Grupo Control Estimulado) que no muestra una tendencia definida de preferencia o aversión (Grupo Neutro), a pesar de que su comportamiento es también consistente entre sesiones.

Por su parte, los animales del grupo “control no estimulado” (Grupo Control Intacto) alternan entre los dos compartimentos del laberinto sin mostrar una tendencia determinada, con una conducta inconsistente, en consonancia con el hecho de que estos animales no reciben estimulación y que en esta prueba se ha utilizado un procedimiento de Condicionamiento hacia un Lugar no sesgado.

Generalmente, la Amígdala ha sido considerada como un sustrato neural implicado en el procesamiento aversivo y el CeA, concretamente, se ha propuesto como el sustrato crítico para asociar la información aversiva con la emoción negativa que genera (Nakagawa *et al.*, 2005).

De hecho, los resultados de estudios llevados a cabo con técnicas lesivas han relacionado al CeA con el procesamiento negativo, y así su bloqueo, además de atenuar por ejemplo el CAL asociado con la retirada de morfina (Kelsey y Arnold, 1994; Watanabe *et al.*, 2002b; Nakagawa *et al.*, 2005), impide la asociación gusto-viscero-aversiva en un modelo de Aprendizaje Interoceptivo Aversivo (Experimento 2, presente Tesis Doctoral).

Ahora los resultados de este experimento implican claramente al CeA en el procesamiento aversivo y los efectos aversivos inducidos por su Estimulación Eléctrica parecen corroborarlo.

Por otra parte, las propiedades reforzantes observadas en algunos animales tras la Estimulación Eléctrica del CeA son también compatibles con los resultados obtenidos por otras investigaciones que han puesto de manifiesto la implicación de la Amígdala (Everitt *et al.*, 2003; Waraczynski, 2003) y, concretamente, del CeA (Zhu y Pan, 2004, 2005) en estas manifestaciones motivacionales. De hecho, algunos autores consideran al subnúcleo central amigdalino (CeA) como un sustrato neural esencial en el aprendizaje de reforzamiento condicionado (Estímulo-Refuerzo) (Zhu y Pan, 2004, 2005). Asimismo, destacar la relevancia de sus conexiones con el Área Tegmental Ventral y el Núcleo Accumbens en los efectos reforzantes de algunas drogas adictivas (DiChiara y North, 1992; Koob *et al.*, 1993, 1998; Naranjo *et al.*, 2001; Georges y Aston-Jones, 2002; Hasue y Shammah-Lagnado, 2002; Baxter y Murray, 2002; Gottfried *et al.*, 2003; Phillips *et al.*, 2003; See *et al.*, 2003).

Más aún, se ha demostrado que algunos de los subnúcleos amigdalinos, incluido el CeA, sustentan la Auto-Estimulación Eléctrica Intracerebral recompensante (Kane *et al.*, 1991; Panagis *et al.*, 1995; Touzani y Velley, 1998). De hecho, diversos estudios



con *c-fos* han mostrado que la Estimulación Eléctrica de las principales zonas cerebrales de refuerzo (por ejemplo, Hipotálamo Lateral) está asociada a incrementos en la actividad celular de algunos subnúcleos amigdalinos, entre ellos, el CeA (Arvanitogiannis *et al.*, 1996; Hunt y McGregor, 1998; Touzani y Velley, 1998; Nakahara *et al.*, 1999).

Todo esto datos permiten suponer que la Estimulación Eléctrica del CeA puede activar sistemas neurobiológicos próximos anatómicamente de refuerzo y aversión que podrían ser disociados farmacológicamente. Para examinar esta posibilidad se llevó a cabo la Segunda Fase del presente experimento con la administración de Naloxona en animales estimulados eléctricamente en el CeA, sin que el antagonista opiáceo produjese efecto alguno sobre los tres grupos de animales desarrollados durante la Primera Fase. Esta ausencia de efecto de la Naloxona sugiere que las propiedades aversivas/reforzantes inducidas por la activación del CeA no implica la participación del Sistema Opiáceo.

En resumen, los datos obtenidos en este experimento muestran que la Estimulación Eléctrica del CeA puede generar preferencias o aversiones hacia los estímulos del entorno con los que se asocia. Esta estimulación podría actuar como sustituto de procesos biológicos aún no determinados. La administración de Naloxona no altera ninguno de los efectos comportamentales inducidos por dicha estimulación, lo cual sugiere que en esta región amigdalina el Sistema Opiáceo no parece ser esencial. Sin embargo, el CeA está considerado como una región implicada en la acción de las drogas de abuso y en los efectos asociados con la retirada de éstas, una manifestación comportamental de recompensa y aversión que ha quedado demostrada en el presente experimento a través de la Estimulación Eléctrica Intracerebral, pero que parece ser mediada por mecanismos neuroquímicos distintos a los opiáceos.

## **EXPERIMENTO 4: Efectos motivacionales de la Estimulación Eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo (PBLE) en una tarea de Condicionamiento Concurrente hacia un Lugar: Bloqueo del efecto reforzante mediante la administración de Naloxona.**

El objetivo del presente experimento es examinar si los resultados obtenidos en el experimento anterior, en los cuales se observa que la administración de Naloxona no logra interrumpir los efectos motivacionales inducidos mediante Estimulación Eléctrica del CeA, podrían deberse a que las manipulaciones procedimentales/quirúrgicas y neuroquímicas que se realizaron en el Experimento 3 eran inapropiadas en algún sentido o si, por el contrario, los datos obtenidos reflejan realmente la escasa relevancia del Sistema Opiáceo en la región amigdalina del CeA.

Parece bien establecido que la Estimulación Eléctrica Intracerebral puede inducir efectos aversivos a través de la activación de estructuras tales como el Área Postrema en tareas de Aprendizaje Interoceptivo Aversivo (Gallo *et al.*, 1988; Agüero *et al.*, 1993a), un efecto que puede ser bloqueado mediante lesiones del Complejo Parabraquial lateral (Agüero *et al.*, 1993a).

Más aún, se ha demostrado la activación del PBLe, junto a otras estructuras cerebrales, tras la administración de varios estímulos habitualmente utilizados para inducir AAvG como, por ejemplo, el NaCl hipertónico (Kobashi *et al.*, 1993) o el LiCl (Yamamoto *et al.*, 1992; Gu *et al.*, 1993; Swank y Bernstein, 1994).

De hecho, las lesiones de esta región PBL impide el AAvG asociado con la administración de morfina (Bechara *et al.*, 1993; Nader *et al.*, 1996) y, más específicamente, las lesiones del PBLe interrumpen el AAvG inducido mediante la administración de NaCl hipertónico (Mediavilla *et al.*, 2000).

Por otra parte, se ha demostrado que la Estimulación Eléctrica del PBLe provoca tanto aversiones como preferencias hacia los estímulos olfatorios-gusto-visceral con los que es asociada (Simón *et al.*, 2007).

Además, existen estudios inmunohistoquímicos con *c-fos* que muestran, entre las numerosas regiones afectadas, la activación del PBLe tras la administración de diversas drogas de abuso (por ejemplo, cocaína, morfina y anfetaminas) así como de sustancias nutritivas (por ejemplo, glucosa y lactosa) que actuarían como reforzadores (Sakai y Yamamoto, 1997; Wang *et al.*, 1999; Yamamoto y Sawa, 2000a).

En este sentido, se ha observado un incremento en el consumo de soluciones apetitivas tras el bloqueo de los receptores opiáceo  $\kappa$  y/o la administración simultánea de agonistas específicos de los receptores  $\mu$  en esta zona parabraquial (Moufid-Bellancourt *et al.*, 1996).

Por su parte, las lesiones específicas del PBle interrumpen el aprendizaje de preferencias gustativas, cuando se utiliza como estímulo visceral la administración intragástrica de productos reforzantes (Aprendizaje Apetitivo Gustativo, AApG) (Sclafani *et al.*, 2001; Zafra *et al.*, 2002), todo lo cual sugiere que el PBle puede estar implicado tanto en los procesos aversivos como recompensantes.

En efecto, el Complejo Parabraquial ha sido relacionado estrechamente con el Sistema Opiáceo y así se ha comprobado que el PBl (incluido el PBle) es una estructura densamente inervada por vías extrínseca y neuronas intrínsecas que sintetizan neuropéptidos opiáceos (Finley *et al.*, 1981; Fallon y Leslie, 1986; Standaert *et al.*, 1986; Moga *et al.*, 1990; Riche *et al.*, 1990; Moufid-Bellancourt *et al.*, 1996; Wolinsky *et al.*, 1996; Gutstein *et al.*, 1998; Chamberlin *et al.*, 1999; Martin-Schild *et al.*, 1999). En esta región se ha detectado una alta densidad de receptores opiáceos  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  (Atweh y Kuhar, 1977; Lynch *et al.*, 1985; Sales *et al.*, 1985; Mansour *et al.*, 1995a, b; Ding *et al.*, 1996; Chamberlin *et al.*, 1999), con receptores  $\mu$  localizados fundamentalmente en los núcleos PBle, PBl central y PBm, mientras que los del tipo  $\delta$  y  $\kappa$  han sido situados tanto en la zona PBl dorsal como en PBl ventral (Lynch *et al.*, 1985; Mansour *et al.*, 1995a, b; Ding *et al.*, 1996).

De acuerdo con todo lo anterior, el objetivo del presente experimento pretende comprobar si, a diferencia de los resultados obtenidos en el estudio previo, ahora la Estimulación Eléctrica del PBle induce aversiones o preferencias por los lugares con los que se asociaba y si estos efectos motivacionales pueden ser bloqueados mediante la administración subcutánea de un antagonista opiáceo (Naloxona) (Simón *et al.*, 2007). El bloqueo de los efectos reforzantes implicaría, a modo de control, que las manipulaciones procedimentales/quirúrgicas y neuroquímicas que se realizaron en el experimento anterior (Experimento 3) no explicarían la ineficacia de la Naloxona para bloquear los efectos de la Estimulación Eléctrica del CeA.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

### **SUJETOS**

Se emplearon 27 ratas de la raza Wistar procedentes del animalario de la Universidad de Granada, cuyos pesos, al comenzar el procedimiento quirúrgico, estaban comprendidos entre 270 y 320 g. De estos animales 20 fueron implantados y 7 fueron utilizados como controles (intactos).

Todos los animales fueron alojados en jaulas plexiglás de 30x30x30 cm. (de características similares a las descritas en el Capítulo I y en el Experimento previo de esta Tesis Doctoral) y mantenidos con comida y agua *ad libitum* durante la semana de habituación previa a la cirugía. Las condiciones ambientales de luz y temperatura fueron mantenidas constantes dentro del mismo rango descrito para los experimentos previos. Las manipulaciones experimentales se llevaron a cabo durante el período de luz.

### **PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO**

- Implante de un electrodo intracerebral en el Núcleo Parabraquial Lateral Externo (PBle):

Las coordenadas utilizadas para acceder al PBle fueron AP= -0.16; L= +2.5; V= +3.0; a partir del índice de referencia interaural (Paxinos y Watson, 1986).

### **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

a) Exploración de los parámetros eléctricos previa al Condicionamiento:

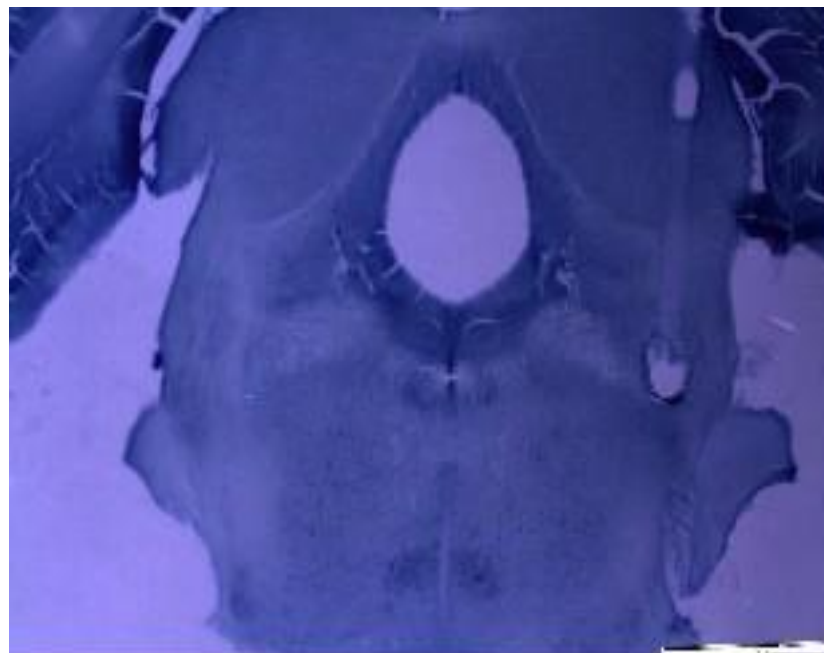
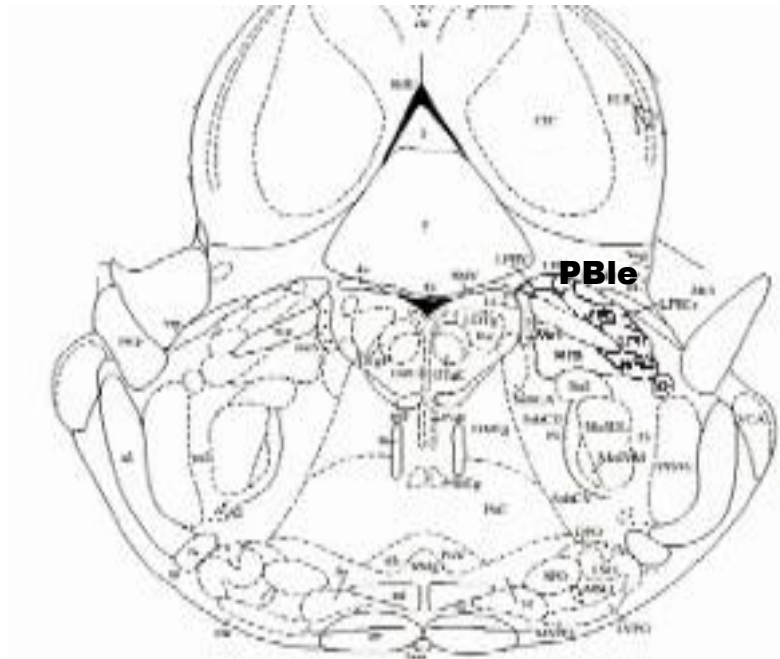
La exploración previa al condicionamiento fue similar a la descrita para el Experimento 3 del presente Capítulo. La intensidad de la corriente que recibieron los animales en el PBle osciló entre 60 y 170  $\mu\text{A}$ . (Media: 94  $\mu\text{A}$ ).

b) Condicionamiento de Preferencia hacia un Lugar (CPL):

El Condicionamiento de preferencias consta de dos fases (*Primera Fase: Preferencias inducidas mediante Estimulación Eléctrica del PBle en una tarea de Condicionamiento Concurrente hacia un Lugar; Segunda Fase: Efectos comportamentales de la administración de Naloxona en animales estimulados en el PBle*), idénticas a las descritas para el Experimento 3 del presente Capítulo.

## HISTOLOGÍA

Concluido el experimento, los animales fueron perfundidos de manera análoga a la descrita en el Experimento 3 del presente Capítulo. Se obtuvieron secciones coronales del cerebro, con un grosor de 50 micras, que fueron montadas y teñidas siguiendo el procedimiento descrito en el Experimento 2 de esta Tesis Doctoral (Fotografía 2.6).



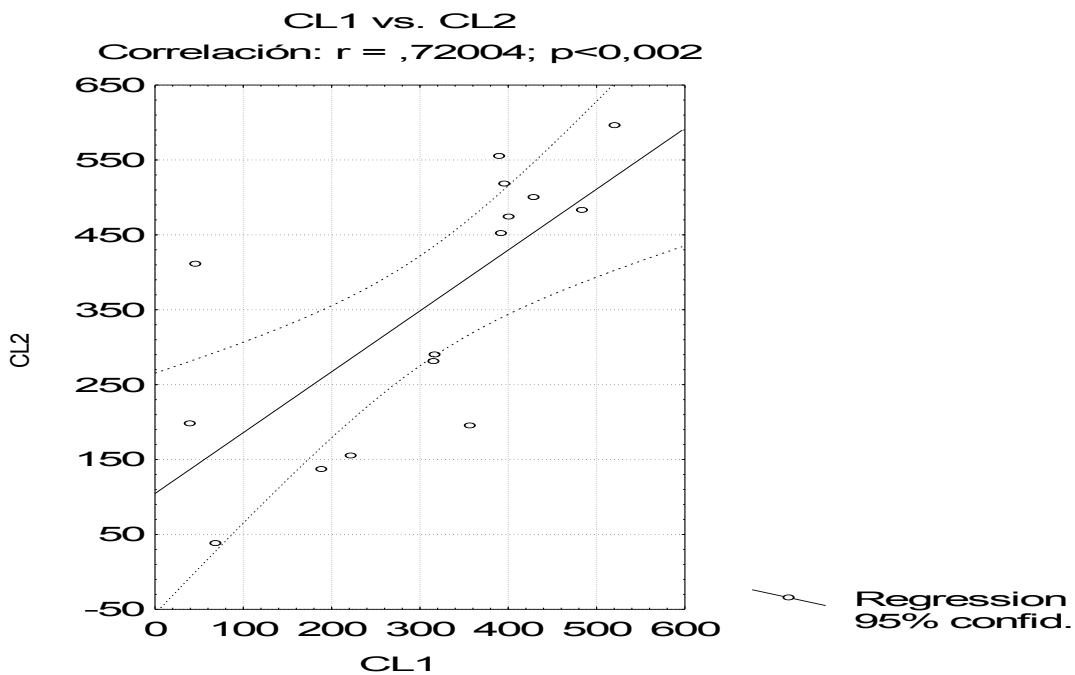
**Fotografía 2.6:** Localización del electrodo intracerebral implantado en el PBLc, tomando como referencia el atlas neuroanatómico de Paxinos y Watson (1986).

## RESULTADOS

- Primera Fase: Preferencias inducidas mediante Estimulación Eléctrica del PBle en una tarea de Condicionamiento Concurrente hacia un Lugar.

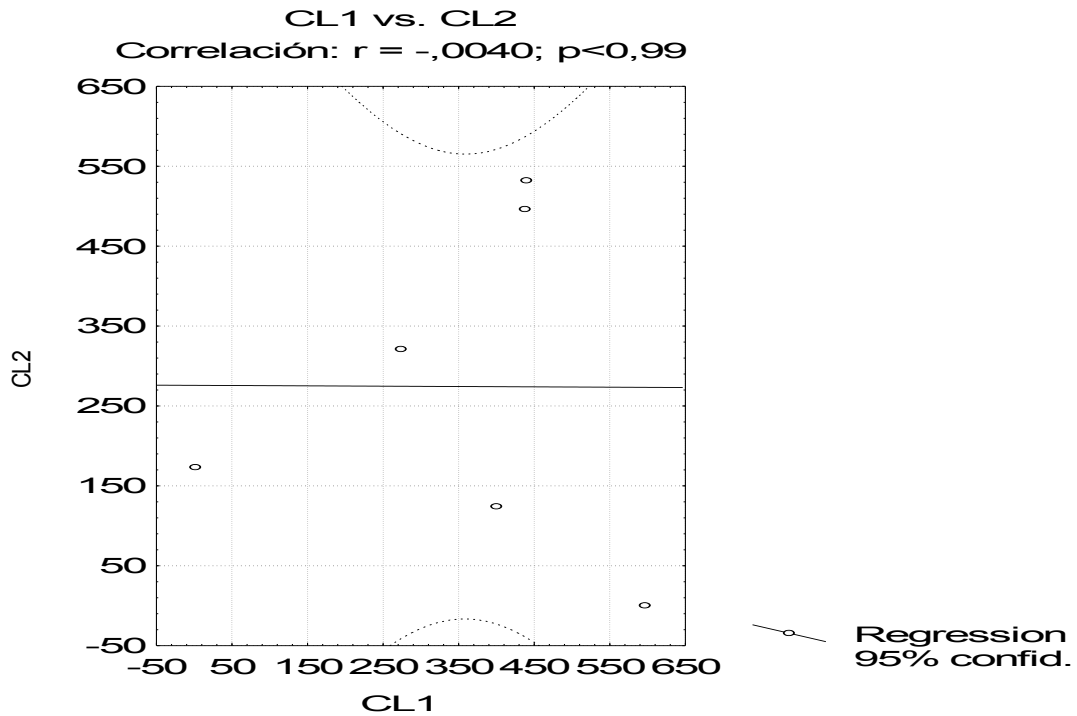
De los 20 animales a los que se implantó un electrodo en el PBle, 2 tuvieron que ser excluidos porque presentaban conducta de giro y 3 porque se les desprendió el implante, con lo cual quedaron 15 animales implantados.

La comparación de la ejecución de los animales experimentales en las dos sesiones de condicionamiento (CLP1 y CPL2) llevadas a cabo en el Laberinto Modelo 1 (Fotografía 2.3), podemos observar una correlación significativa entre estos dos días ( $R= 0,77$ ;  $p<0,001$ ), igual a la observada en el Experimento 3 del presente Capítulo, lo cual significa que su conducta de preferencia o evitación por el lugar estimulado es consistente (Gráfica 2.4).



**Gráfica 2.4:** Matriz de correlación de los sujetos del Grupo “Implantado” del PBle con respecto a la proporción de tiempo de permanencia en el compartimento Estimulado del Laberinto Modelo 1 en cada una de las dos sesiones de condicionamiento.

Por su parte, los animales del Grupo Control ‘sin estimulación’ (intactos), alternan entre ambos laterales del corredor ( $R= -0,057$ ;  $p<0,95$ ), sin que se observaran preferencias por una u otra zona del laberinto (Gráfica 2.5).

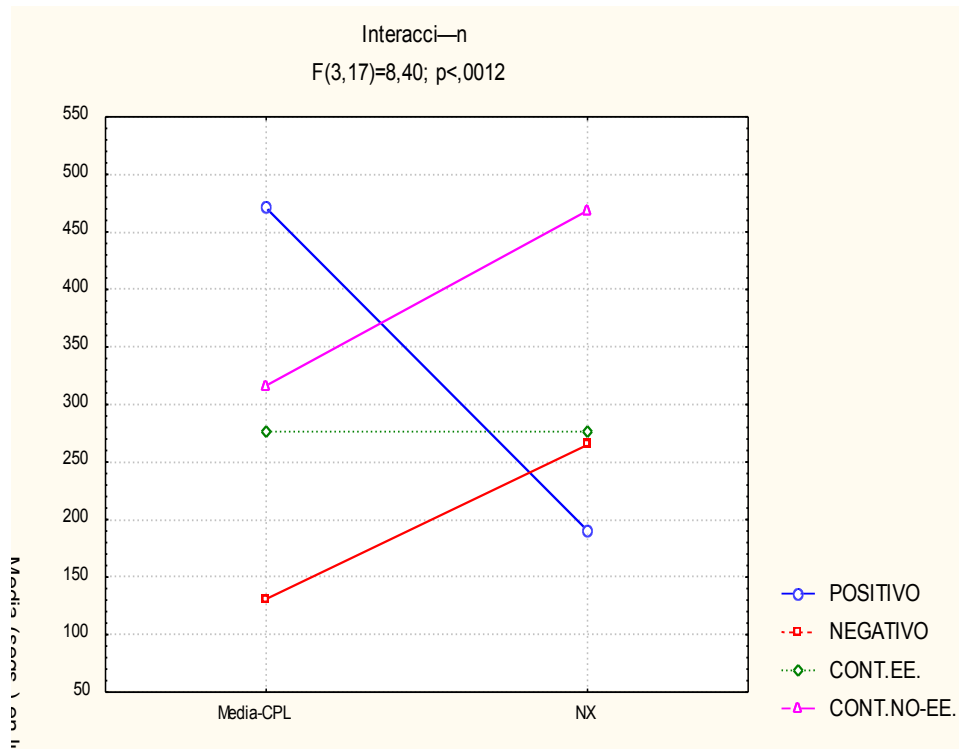


**Gráfica 2.5:** Matriz de correlación para los sujetos del Grupo Control Intacto del PBl respecto a la proporción de tiempo que permanecen en uno de los dos compartimentos, seleccionado al azar, en cada una de las dos sesiones de condicionamiento de la primera fase.

De acuerdo con el criterio conductual utilizado en el Experimento 3 para la clasificación de los animales en los distintos grupos, se incluyeron 7 animales en el Grupo Positivo, 4 en el Grupo Control Estimulado y 4 en el Grupo Negativo.

- *Segunda Fase: Efectos comportamentales de la administración de Naloxona en animales estimulados en el PBl.*

Al igual que en el Experimento 3, el análisis estadístico llevado a cabo en esta segunda fase se realiza a partir de la proporción del tiempo de permanencia de los animales en el compartimento del Laberinto Modelo 2 (Fotografía 2.4) asociado a la Estimulación Eléctrica durante los dos ensayos de condicionamiento de la primera fase. Para el análisis de los datos se utilizó un ANOVA unifactorial intrasujeto. Los resultados de esta Fase se resumen en la Gráfica 2.6:



**Gráfica 2.6:** Media del tiempo de permanencia (segs.) en el compartimento estimulando el Pble de los dos ensayos de condicionamiento de la primera fase y tras la administración de Naloxona.

Los resultados obtenidos en el ANOVA global indican diferencias significativas de la interacción entre los grupos [F(3, 17)=8.40; p<0,001] (Gráfica 2.6). El análisis individual de cada uno de los grupos muestra que sólo el Grupo Positivo presenta diferencias significativas cuando se compara la media del tiempo de permanencia en el compartimento estimulado durante de la primera fase experimental y tras la administración de Naloxona. Este dato indica que la administración de Naloxona bloquea la preferencia inducida por la Estimulación Eléctrica del Pble [F(1, 6)=16,14; p<0,007] (Gráfica 2.6).

En el caso del Grupo Negativo, la Naloxona reduce la aversión producida por la Estimulación Eléctrica del Pble, aunque ahora, en parte por el reducido número de animales, las diferencias no alcanzan significancia estadística [F(1, 3)=1,80; p<0,27] (Gráfica 2.6).

Esta ausencia de efecto de la Naloxona también se observa tanto en el Grupo Control Estimulado [F(1, 3)=0.00; p<0,98] como en el Control No Estimulado (Intacto) [F(1, 5)=4,68; p<0,08], siendo ambas diferencias no significativas (Gráfica 2.6).



## DISCUSIÓN

Los resultados de la Primera Fase del presente experimento ponen de manifiesto que la Estimulación Eléctrica del PBle genera conductas de preferencia (Grupo Positivo) y efectos aversivos (Grupo Negativo) hacia los estímulos del entorno con los que es asociada, un resultado que es consistente a través de las dos sesiones de Condicionamiento. Además, aparece un grupo de animales experimentales estimulados (Grupo Control Estimulado) que no muestra una tendencia clara de preferencia.

Por su parte, los animales del grupo ‘control sin estimulación’ (Grupo Control Intacto) alternan entre los dos compartimentos del laberinto sin mostrar una tendencia de preferencia definida e inconsistente, algo que cabría esperar si se tiene en cuenta que estos animales no reciben estimulación y que se ha utilizado un procedimiento de Condicionamiento no sesgado.

Estos datos reproducen los resultados obtenidos en diversos estudios llevados a cabo en este laboratorio con este mismo modelo de Condicionamiento hacia un Lugar y también dentro del Aprendizaje Gustativo (Simón *et al.*, 2007).

Estos resultados son compatibles con otros obtenidos previamente en este mismo laboratorio y en los que las lesiones del PBle bloquean el AAvG Concurrente asociado con la administración de NaCl hipertónico (Mediavilla *et al.*, 2000). Otros laboratorios han conseguido resultados parecidos utilizando tareas de Condicionamiento Aversivo tanto Gustativo (AAvG) como hacia un Lugar (CAL), aunque con lesiones menos específicas del PBI (que supuestamente incluyen el PBle) utilizando morfina (Bechara *et al.*, 1993; Nader *et al.*, 1996).

Más aún, la Estimulación Eléctrica del Área Postrema ha sido utilizada como agente aversivo del Aprendizaje Interoceptivo Aversivo (Gallo *et al.*, 1988; Agüero *et al.*, 1993a), un efecto que puede ser bloqueado mediante lesiones amplias del Complejo Parabraquial lateral (que al parecer incluye el PBle) (Agüero *et al.*, 1993a).

Por otra parte, los resultados del presente experimento sugieren que el PBle participa también en procesos de recompensa cerebral (Simón *et al.*, 2007), un resultado compatible con observaciones previas en las que se ha observado activación del PBle (y otras muchas áreas cerebrales) tras la administración intragástrica de nutrientes (por ejemplo, lactosa, sacarosa, glucosa, maltosa o

policosa) (Sakai y Yamamoto, 1997; Wang *et al.*, 1999; Yamamoto y Sawa, 2000a) o de sustancias apetitivas (por ejemplo, sacarina) (Yamamoto *et al.*, 1994; Yamamoto y Sawa, 2000b), así como tras la administración de diversas drogas de abuso (por ejemplo, cocaína, morfina y anfetaminas) (Sakai y Yamamoto, 1997; Yamamoto y Sawa, 2000a, b; Grabus *et al.*, 2004). Por el contrario, tanto las lesiones del Área Parabraquial en general, incluyendo el PBle (Edwards y Ritter, 1989), o lesiones específicas del PBle (Zafra *et al.*, 2002), interrumpen la preferencia por comida apetitosa o por estímulos gustativos asociados previamente con la administración intragástrica de comida predigerida reforzante, respectivamente.

Sin embargo, existen estudios que no han podido demostrar la participación de la región parabraquial lateral en los procesos de refuerzo (Bechara *et al.*, 1993; Jaeger y Van der Kooy, 1996).

Finalmente, los resultados del presente experimento incluyen un grupo de animales en el que no se manifiesta una clara preferencia o aversión por una determinada localización del laberinto, sugiriendo que la Estimulación Eléctrica es ineficaz, o más probablemente, que pueda estar activando simultáneamente sistemas que codifican aspectos motivacionales positivos y negativos (Simón *et al.*, 2007). Teóricamente, una modificación en los parámetros de la Estimulación Eléctrica utilizados podría hacer que los animales se decantaran por uno u otro compartimento, algo similar a lo que se puede observar tras la utilización de diferentes dosis de una determinada droga, o también, al actuar sobre distintos tipos de receptores de una misma célula. Estas últimas posibilidades, de todos modos, no han sido examinadas por el momento.

Más aún, los resultados de la Primera Fase del presente experimento son compatibles con la idea de que esta misma estructura estaría implicada tanto en los procesos motivacionales positivos como en los negativos (Salamote, 1994; Yamamoto *et al.*, 1994; Reynold y Berridge, 2002). De hecho, la estimulación química diferencial de los receptores  $\mu$  y  $\kappa$  del PBl mostró que inducía preferencias y aversiones, respectivamente, en función de los sistemas activados (Moufid-Bellancourt *et al.*, 1996).

En la Segunda Fase del presente experimento se examinan los efectos reforzantes de la administración subcutánea de Naloxona en animales estimulados eléctricamente en el PBle (Simón *et al.*, 2007).

La administración de Naloxona provoca el bloqueo del efecto recompensante de la Estimulación Eléctrica de manera que los animales Positivos se comporten de manera similar a los animales Negativos. La Naloxona, aunque es un antagonista opiáceo no selectivo, ejerce sus efectos a través de los receptores opiáceos  $\mu$  (Skoubis *et al.*, 2001), por lo que es probable que bloquee la acción reforzante de la Estimulación Eléctrica del PBlé a través de los receptores opiáceos  $\mu$ .

Sin embargo, los antagonistas opiáceos no bloquean los efectos recompensante producidos ni por la administración intragástrica de carbohidratos (Azzara *et al.*, 2000) ni por el sabor dulce de la fructosa (Baker *et al.*, 2004), aunque sí reducen las preferencias por soluciones apetitivas tales como la sacarina o la sacarosa (Le Magnen *et al.*, 1980; Levine *et al.*, 1982; Agmo *et al.*, 1995).

Por otro lado, estudios de Condicionamiento hacia un Lugar muestran que los antagonistas opiáceos, además de provocar aversión (CAL) hacia el lugar con el que se asocian, inhibe la preferencia (CPL) inducida por morfina (Mucha *et al.*, 1982; Shippenberg y Elmer, 1998; Manzanedo *et al.*, 2001b).

En resumen, todos estos resultados abogan por una implicación del Sistema Opiáceo en el procesamiento hedónico apetitivo (Bozarth y Wise, 1981; Stolerman, 1985; Kelley *et al.*, 2002; Cardinal *et al.*, 2004; Simón *et al.*, 2007), aunque hay algunos estudios que también sugieren un papel relevante de los opiáceos en el procesamiento aversivo (Bechara *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1995).

Existen estudios que han puesto de manifiesto la implicación del Complejo Parabraquial en los procesos aversivos inducidos por los opiáceos, demostrándose la existencia de neuronas del Complejo Parabraquial implicadas en el procesamiento del dolor que pueden ser activadas mediante la administración de morfina (Huang *et al.*, 1995).

Esta ausencia de efecto de la Naloxona sobre las propiedades aversivas de la estimulación del PBlé puede ser debida al escaso número de animales que mostraron aversión espacial por dicha estimulación (4 animales), en comparación con los 7 animales que mostraban preferencia por el lugar estimulado. Esta explicación es plausible con la moderada tendencia que muestra este Grupo Negativo en un análisis descriptivo de la gráfica de resultados (ver Gráfica 2.6).

Por lo tanto, la posible implicación del Sistema Opiáceo tanto en procesos aversivos como apetitivos corrobora los resultados obtenidos por este laboratorio en los cuales se mostraba que la activación del PBle mediante Estimulación Eléctrica producía aversiones y/o preferencias tanto por los sabores como por los lugares asociados, siendo los efectos apetitivos hacia un lugar bloqueados mediante la administración de un antagonista opiáceo (Naloxona) (Simón *et al.*, 2007). Un resultado similar fue producido por otro laboratorio que mostró bloqueo de preferencias hacia un lugar inducidas por sacarosa con antagonistas tanto opiáceos como dopaminérgicos (Agmo *et al.*, 1995). El efecto común de estos dos antagonistas de sistemas neuroquímicos distintos (opiáceos y dopamina) no hace más que subrayar la importancia de la interacción entre ambos sistemas.

En conclusión, los datos obtenidos en el Experimento 4 del presente Capítulo demuestran que la Estimulación Eléctrica del PBle genera tanto preferencias como aversiones por los estímulos espaciales con los que se asocia. Esta estimulación actuaría como un sustituto de los procesos biológicos que aún han de ser determinados. El efecto recompensante de la estimulación fue completamente bloqueado mediante la administración de Naloxona, mientras que el efecto aversivo tiende a dicha supresión. Además, el PBle, el cual ha sido propuesto como una región en la cual actuaría las drogas relacionadas con recompensa y con la ingesta de comida, está también implicado en el procesamiento de las recompensas de la comida natural, así como en el procesamiento aversivo de sustancias tóxicas y, como ha quedado demostrado en el presente experimento, en la inducción artificial de recompensas y aversiones generadas por la Estimulación Eléctrica Intracerebral a través de mecanismos neuroquímicos opiáceos.



**CAPÍTULO III:**

**EL EJE ANATÓMICO VAGAL-PARABRAQUIAL-AMIGDALINO  
EN LA NUTRICIÓN A CORTO PLAZO: RELEVANCIA DEL  
SISTEMA OPIÁCEO**



La ingesta de alimentos es un proceso comportamental complejo que implica factores centrales y periféricos (Berthoud, 2008; Woods, 2009; Berthoud y Münzberg, 2011). Estos sistemas regulan comportamientos tales como el volumen de la ingesta de comida, en unos aumentando o manteniendo la ingesta actual (Davis y Levine, 1977; van Vort y Smith, 1983; Sclafani, 1995) y en otros suprimiendo la ingesta de comida o acelerando los procesos de Saciación (Deutsch, 1985; Friedman, 1991; Grennberg, 1996; Baird *et al.*, 2001a, b).

Se considera que el proceso de Saciación a Corto Plazo, responsable de la finalización y del volumen de la ingesta, parece depender particularmente de señales neurales que se originan a diferentes niveles del tracto gastrointestinal y son rápidamente transmitidas al Sistema Nervioso Central (Blundell *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 1999; Schwartz, 2000). Este procesamiento se lleva a cabo fundamentalmente a través del Nervio Vago (González y Deutsch, 1981; Louis-Sylvestre, 1983; Schwartz y Moran, 1996; Phillips y Powley, 1998; Schwartz *et al.*, 1999; Schwartz, 2000; Peters *et al.*, 2006; Berthoud, 2008) y, a través del área caudal del Núcleo del Tracto Solitario (NTSc) (Hyde y Miselis, 1982; Shapiro y Miselis, 1985; Norgren y Smith, 1988; Altschuler *et al.*, 1989, 1992; Barraco *et al.*, 1992), hacia el área Parabraquial Lateral (PBl) (Loewy y Burton, 1978; Herbert *et al.*, 1990) y, más específicamente, al subnúcleo Parabraquial lateral externo (PBle) (Loewy *et al.* 1990; Jia *et al.*, 1994; Saper, 1995). Esta vía visceral vagal proyecta al Tálamo (Yamamoto *et al.*, 1992) y la Amígdala (Saper y Lowey, 1980; Moga *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1993, Jia *et al.*, 1994), especialmente al Subnúcleo Central Lateral (CeL) (Bernard *et al.*, 1993; Jia *et al.*, 1994; Bourgeois *et al.*, 2001), y, finalmente de manera masiva y a través de la vía extratalámica, hacia la porción caudal de la Corteza Insular Gustativa (CIGc) (Ito, 1992, 1994) (ver Figura 0.3).

Así, el Pble y su relevo límbico (CeL), pueden actuar como diana cerebral de las aferencias viscero-sensoriales de segundo orden y donde la información nutritiva finaliza o puede interactuar fisiológicamente (Hermann y Rogers, 1985; Baird *et al.*, 2001a, b; Karimnamazi *et al.*, 2002).

Estas conductas regulatorias de carácter nutritivo han sido relacionadas con distintos sistemas neuroquímicos, entre ellos, el Sistema Opiáceo (Stapleton *et al.*, 1979; Kirkham y Blundell, 1984, 1986; Carr *et al.*, 1991; Higgs y Cooper, 1997; Glass *et al.*, 1999b; Zhang y Kelley, 2000; Richardson *et al.*, 2005).



En general, parece bien establecido que la manipulación del Sistema Opiáceo cerebral afecta el consumo de comida y líquidos, aumentándolos en el caso de los agonistas y disminuyéndolos si se utilizan fármacos antagonistas (Kirkham y Blundell, 1984, 1986; Carr *et al.*, 1991; Parker *et al.*, 1992; Giraudo *et al.*, 1998; Ferraro *et al.*, 2002; Frisina y Sclafani, 2002; Zhang y Kelley, 2002). Según algunos autores estos resultados implican la participación de procesos recompensantes orosensoriales (Hipótesis Hedónica) (Cooper, 1980, 1983; Kirkham y Cooper, 1988a, b; Parker *et al.*, 1992; Kanarek *et al.*, 1997; Yeomans y Gray, 1997; Yu *et al.*, 1999; Kelley *et al.*, 2002; Richardson *et al.*, 2005), mientras que alternativamente otros investigadores sugieren que dichos resultados sugieren la implicación del Sistema Opiáceo en los procesos post-ingestivos de la comida (Hipótesis Energética) (Beczowska *et al.*, 1992, 1993; Schwarz-Stevens *et al.*, 1992; Glass *et al.*, 1999a, b; Glass *et al.*, 2001; Frisina y Sclafani, 2002).

Estos efectos se han observado tras la administración específica de los opiáceos en una gran variedad de centros cerebrales relacionados con la ingesta, entre otros, el Complejo Parabraquial (Lynch *et al.*, 1985; Majeed *et al.*, 1986; Mansour *et al.*, 1988; Carr *et al.*, 1991; Robert *et al.*, 1991; Moufid-Bellancourt y Velley, 1994; Wolinsky *et al.*, 1996; Nicklous y Simansky, 2003; Wilson *et al.*, 2003) y el CeA (Li y Rowland, 1993; Kelsey y Arnold, 1994; Giraudo *et al.*, 1998; Swanson y Petrovich, 1998; Glass *et al.*, 2000; Gracy *et al.*, 2001; Le Guen *et al.*, 2001; Frenois *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2002b).

De acuerdo con todo lo anterior, el objetivo del presente Capítulo ha sido analizar la implicación del eje neuroanatómico Vago-PBle-CeL en estos procesos nutritivos y su relación con el Sistema Opiáceo. Así, este Capítulo consta de 3 experimentos independientes, en los que se analiza sucesivamente la implicación del Nervio Vago y del PBle en la nutrición a Corto y Largo Plazo (Experimento 5), la implicación del PBle en la regulación del volumen de la ingesta a través de la técnica de extracción intragástrica parcial (“Pumping-out”) y que aparentemente se procesarían mediante mecanismos nutritivos de procesamiento rápido, a Corto Plazo (Experimento 6). Finalmente, se examinará la relevancia del Sistema Opiáceo en los efectos nutritivos (a Corto Plazo) inducidos mediante lesiones electrolíticas del PBl, del PBle o del CeL (Experimento 7).

## **EXPERIMENTO 5: Participación del Nervio Vago y del Núcleo Parabraquial Lateral Externo (PBle) en la Nutrición a Corto y a Largo Plazo.**

Distintas investigaciones han demostrado que el Nervio Vago es esencial en la ingesta de comida a Corto Plazo (Snowdon y Epstein, 1970; Mordes *et al.*, 1979; González y Deutsch, 1981; Davis *et al.*, 1994; Phillips y Powley, 1998; Furness *et al.*, 2001; Date *et al.*, 2002; Zafra *et al.*, 2003, 2004) y en la regulación hidromineral (Kraly *et al.*, 1975; Smith y Jerome, 1983; Sakaguchi y Yamazaki, 1986).

Con respecto a la Saciación a Corto Plazo, la participación del Nervio Vago ha sido estudiada desde diferentes aproximaciones experimentales, por ejemplo, analizando el patrón de ingesta de los sujetos vagotomizados (Snowdon, 1970; Mordes *et al.*, 1979; González y Deutsch, 1981; Smith *et al.*, 1981; Kral, 1983; Sclafani y Kramer, 1983; Furness *et al.*, 2001; Date *et al.*, 2002). Sin embargo, los resultados, frecuentemente contradictorios, observados en estos estudios han sido explicados en términos de diferencias en el periodo de recuperación o de las distintas dietas utilizadas (Kelly *et al.*, 1999). Así, en los estudios con largos periodos de recuperación se produce un sobreconsumo en las dietas no familiares, que se normaliza en posteriores exposiciones a esa dieta (Castonguay y Bellinger, 1987; Chavez *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 1999). Esta recuperación o normalización de la ingesta ha sido explicada a través de un mecanismo de Sacidad Condicionada, según el cual el animal habría aprendido, por un proceso asociativo, el valor calórico de la comida (Treit y Spetch, 1986) o también por la acción de mecanismos redundantes, esto es, vías sensoriales independientes a la acción de la Vagotomía (Chavez *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 1999).

Por otro lado, cuando la ingesta de comida se lleva a cabo inmediatamente después de la Vagotomía se produce el aumento de la ingesta de alimento sólido y líquido durante las primeras horas transcurridas desde su presentación tras la intervención quirúrgica (6, 12 y 24 horas; a Corto Plazo), pero no posteriormente (48 y 72 horas; a Largo Plazo); y ello independientemente de la novedad de la dieta (Phillips y Powley, 1998; Zafra *et al.*, 2003, 2004). En este caso, la interrupción de las aferencias viscerales habría alterado los procesos de Saciación a Corto Plazo para que posteriormente otros factores independientes a las fibras afectadas desempeñen un papel regulatorio, compensando y contrarrestando los déficits producidos por la lesión de las fibras vagales (Zafra *et al.*, 2003).

Así pues, estos datos sugieren que los animales desaferentados vagalmente muestran dificultad para regular el proceso de Saciación a Corto Plazo, bien porque carecen de experiencia previa (dieta no familiar) (Chavez *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 1999, 2000) o bien porque, aunque tengan experiencia previa (dieta familiar), las aferencias sensoriales necesarias no están disponibles (Phillips y Powley, 1998; Zafra *et al.*, 2003, 2004).

En este sentido, está ampliamente documentado la implicación de las aferencias vagales en la detección de señales mecanorreceptoras y quimiorreceptoras procedentes de distintos segmentos del Tracto Gastrointestinal (González y Deutsch, 1981; Ritter *et al.*, 1994), cuyos primeros relevos se sitúan en la zona intermedio-caudal del NTS (NTSc), los cuales, a su vez, proyectan hacia la parte interna del PBle, así como hacia el subnúcleo dorsomedial del NTS que inerva la parte externa del PBle (Fulwiler y Saper, 1986; Herbert *et al.*, 1990; Jia *et al.*, 1994; Karimnamazi *et al.*, 2002), lugar donde se concentran las fibras que transportan la información viscer-quimiosensorial (Bernard *et al.*, 1993) (ver Figura 0.3).

De hecho, algunos estudios neurofisiológicos, han demostrado la sensibilidad de las neuronas del PBle tras diversas manipulaciones de índole visceral como, por ejemplo, de la distensión gástrica, una importante señal sensorial relacionada con los mecanismos de Retroalimentación Negativa implicados en el proceso de Saciación (Suemori *et al.*, 1994; Baird *et al.*, 2001a, b; Berthoud *et al.*, 2001; Vrang *et al.*, 2003; Mazda *et al.*, 2004).

De conformidad con estos datos, diversos experimentos llevados a cabo en este laboratorio han demostrado que las lesiones del PBle interrumpen el aprendizaje discriminativo gustativo, tanto en el caso de la administración intragástrica de sustancias nocivas (AAvG) (Mediavilla *et al.*, 2000) como de productos reforzantes (alimentos predigeridos) (AApG) (Zafra *et al.*, 2002). Es decir, la participación del PBle parece ser relevante cuando las demandas temporales de la tarea son estrictas (Mediavilla *et al.*, 2000; Zafra *et al.*, 2002). En efecto, se ha demostrado que la lesión del PBle impide la adquisición del AAvG y del AApG Concurrente (a Corto Plazo), presumiblemente por interrumpir la transmisión de la información viscerosensorial ascendente procedente del Nervio Vago (Mediavilla *et al.*, 2000; Zafra *et al.*, 2002).

Además, el PBle es una de las zonas de actuación de diversas sustancias relacionadas con el control y regulación de la ingesta, como, por ejemplo, el Mercaptoacetato, el 2,5-AM, el Neuropeptido-Y, la Fenfloramina, la

Colecistoquinina, la Secretina o los Opiáceos (Li y Rowland, 1993, 1994, 1995; Ritter *et al.*, 1994; Elmquist *et al.*, 1997; 1998; Rowland *et al.*, 2000; Trifunovic y Reilly, 2001; Cheng *et al.*, 2011). De hecho, las lesiones del PBl (que incluyen al PBle) bloquean las acciones de estos agentes farmacológicos o endocrinos sobre la ingesta (Calingasan y Ritter, 1993; Trifunovic y Reilly, 2001; Becskei *et al.*, 2007). Más aún, la activación del PBl tras la administración de estos agentes junto con la modificación de la ingesta que éstos inducen puede ser bloqueada o atenuada tras la aplicación de Vagotomías (Smith *et al.*, 1981; Ritter *et al.*, 1994; Li y Rowland, 1995; Horn *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2004; Abbott *et al.*, 2005).

De acuerdo con estos planteamientos, en el presente experimento se analizó la ingesta de comida sólida y líquida a Corto y Largo Plazo en dos grupos de animales: uno vagotomizado y otro con lesión del PBle. En el grupo de animales vagotomizados se indujo la desaferentación viscerosensorial vagal mediante la administración de Capsaicina (Zafra *et al.*, 2003), que ha sido la técnica quirúrgica más reciente para inducir Vagotomías (Jancsó *et al.*, 1987; Raybould y Taché, 1989; Hölzer, 1991; Berthoud y Neuhuber, 2000; Blackshaw *et al.*, 2000). De acuerdo con los estudios previos cabría esperar que los animales capsaicinados manifestaran una mayor ingesta de comida sólida y líquida en las primeras exposiciones (al carecer de las fibras viscerosensoriales vagales encargadas de los procesos de Saciación a Corto Plazo). En las posteriores exposiciones nutritivas podrían producir una compensación probablemente a través de mecanismos regulatorios redundantes que utilizarían otras vías o a través de fibras de la vía vagal resistentes a la Capsaicina (Zafra *et al.*, 2003).

Por su parte, los animales con lesiones del PBle, un núcleo troncoencefálico donde se procesan las aferencias viscerosensoriales del Nervio Vago (Bernard *et al.*, 1993), mostrarían también un aumento sólo en la ingesta a Corto Plazo de comida sólida y líquida, al haber interrumpido los procesos de Saciación a Corto Plazo.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

### **SUJETOS**

Se utilizaron 42 ratas Wistar con una media de peso corporal de 293.2 g. al principio de los experimentos. Las ratas fueron aleatoriamente distribuidas en dos

grupos: Grupo 1: grupo Capsaicinado (n=12) y su grupo Control (n=10); y Grupo 2: grupo lesionado en el PBle (n=10) y su grupo control (n=10).

Todos los animales fueron alojados individualmente en jaulas de metacrilato de 30x15x30 y mantenidos en unas condiciones de temperatura que oscilaba entre 22°-25°, con ciclos de luz-oscuridad de 12:12 horas y con libre acceso a agua y comida (Panlab, S.L., Barcelona).

## **PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO**

### **- GRUPO 1 (Animales Capsaicinados):**

El tratamiento de Capsaicina perivagal fue llevado a cabo siguiendo un procedimiento modificado del método usado por Raybould y Taché (1989). Los animales fueron anestesiados con Pentotal Sódico (46.3 mg/kg., i.p.; Tiopental Sódico, Abbot Laboratories) y sometidos a una incisión de 3 cm. en la línea media de la pared abdominal. El esófago quedó expuesto y con el máximo cuidado fué colocado sobre una lámina de parafina alrededor de los tejidos a fin de minimizar la propagación de la Capsaicina (Fluka, 98%). A continuación el esófago fue rodeado con un algodón que había recibido una solución de Capsaicina (1 mg. de Capsaicina disuelto en un ml. de vehículo: 10% Tween 80 en aceite de oliva), proceso que era repetido cada 5 min. La cantidad total de Capsaicina aplicada fue de 1 ml. por animal. Transcurrido el periodo de 30 min. que duraba la aplicación de Capsaicina el área era lavada con una solución salina y secada con material estéril. Finalmente la incisión era cerrada con varios puntos de sutura y se aplicaba un antiséptico en la herida (Betadine, Sarget Lab.). La administración intramuscularmente de 0,1ml. de Penicilina (1. 000.000 IU, Penilevel, Lab. Ern, Barcelona, España) con fines profilácticos pone fin al proceso.

El procedimiento quirúrgico seguido en el grupo Control fue idéntico al anteriormente mencionado excepto que los animales sólo recibían perivagalmente la administración del vehículo (10% Tween 80 en aceite de oliva).

### **- GRUPO 2 (Animales lesionados en el PBle):**

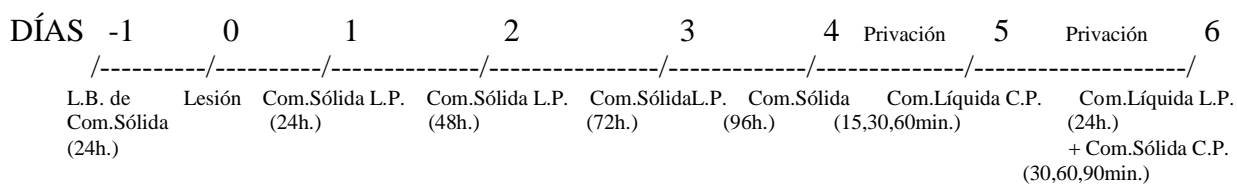
Las lesiones electrolíticas bilaterales del PBle se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento descrito para el caso de las lesiones del CeA en el Experimento 2 de la presente Tesis Doctoral. Sin embargo, ahora las coordenadas estereotáxicas tomadas a partir del atlas de Paxinos y Watson (1986) fueron: AP: -0.16 mm.; L: +-2.4 mm.; V: +3.0 mm. Por su parte, los parámetros de la corriente eléctrica que se les aplicó

fueron de 0.3 mA. durante 10 seg., a través de un electrodo monopolar aislado con INSL-X en toda su extensión excepto en su parte distal.

La lesión ficticia de los animales controles reproduce todos los pasos anteriores, si bien la coordenada vertical que se usó fue de +3.5 mm. (para no afectar al Pble) y no se produjo paso de corriente a través del electrodo.

## PROCEDIMIENTO COMPORTAMENTAL

Los dos grupos de animales fueron sometidos a un mismo procedimiento experimental que se describe a continuación. El día previo a la cirugía se cuantificó la ingesta de comida sólida (Panlab, S.L.) a las 24 horas (Línea Base de Comida Sólida a L.P.). Inmediatamente después de la cirugía, los animales fueron devueltos a sus jaulas con agua y comida sólida, contabilizándose la ingesta de esta última a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la operación (Comida Sólida a L.P.). Al finalizar la medida de este 4º día post-operatorio se privó a los animales de agua y comida. El 5º día post-operatorio se les ofreció a los animales una solución de Sacarosa (10%) (Comida Líquida) y se contabilizó su ingesta a los 15, 30 y 60 min. de haberla presentado (Comida Líquida a C.P.), finalizada la cual se les ofreció a los animales la misma solución de Sacarosa y se midió su ingesta a las 24 horas (Comida Líquida a L.P.). Este mismo día (6º día postoperatorio) se midió de nuevo la ingesta de Comida Sólida pero esta vez a los 30, 60 y 90 min. de ser presentada (Comida Sólida a C.P.). Se midió el peso corporal de los animales diariamente durante este periodo temporal (Figura 3.1).



**Figura 3.1:** Secuencia temporal del experimento.

## PRUEBA DE VAGOTOMÍA

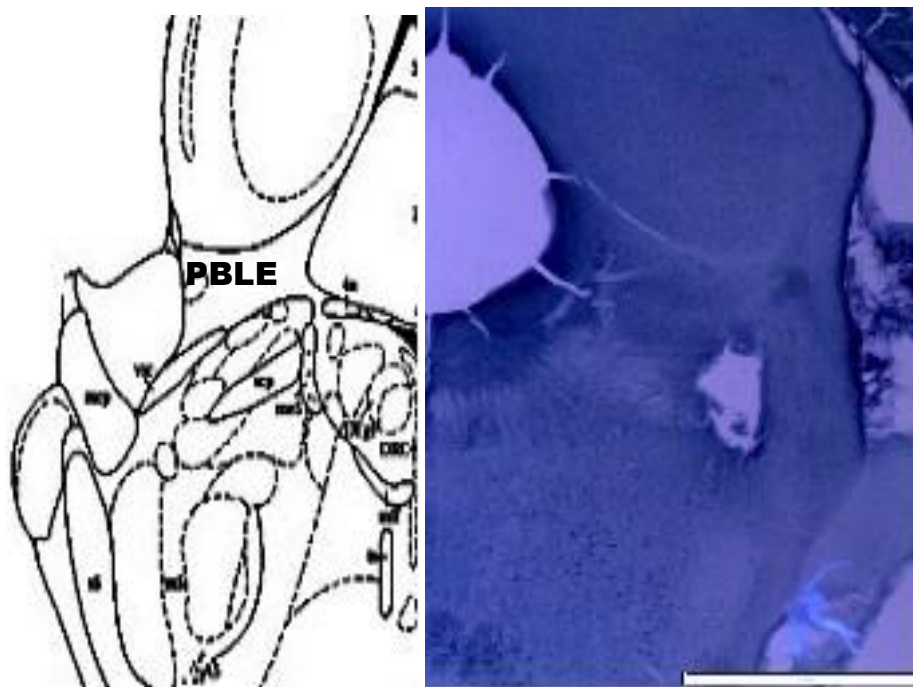
Al finalizar el experimento, a los animales del Grupo 1 (Capsaicinado) se les aplicó la prueba de Vagotomía propuesta por Martín *et al.* (1978). El objetivo era

comprobar el estado del Nervio Vago y particularmente si, accidentalmente, había sufrido daño total durante la intervención quirúrgica. En esta prueba se extrae y pesa el estómago de los animales después de 12 horas de privación. El criterio establecido para determinar si la Vagotomía había sido completa, y por lo tanto para la exclusión de los datos de ese animal concreto, es que se produzca una proporción mayor de 0.020 entre el peso del estómago y el peso del animal previo a la privación de la comida.

## HISTOLOGÍA

Al finalizar el experimento, todos los animales del Grupo 2 (Lesión del PBL) fueron profundamente anestesiados con Tiopental sódico (80 mg/Kg, ABBOTT, Madrid) y perfundidos intracardiamente con formaldehído (10%). Los cerebros fueron extraídos y conservados en formaldehído en una solución al 10%, al menos durante 48 horas antes de su laminación

Las lesiones electrolíticas fueron localizadas en secciones coronales, teñidas con Violeta de Cresilo y examinadas con un microscopio óptico (Olympus, CO 11) (Fotografía 3.1).



**Fotografía 3.1:** Localización anatómica de la lesión electrolítica del PBL, tomando como referencia el atlas neuroanatómico de Paxinos y Watson (1986).

## **RESULTADOS**

### **- GRUPO 1 (Animales Capsaicinados):**

#### **PRUEBA DE VAGOTOMÍA**

La prueba de Vagotomía mostró que ninguno de los animales había sufrido una Vagotomía completa (en todos los casos la razón del estómago al peso corporal total antes del ayuno fue  $<0.020$ ). No hubo diferencias estadísticamente significativas en esta medida entre el grupo Capsaicinado y su grupo control [ $F(1, 20) = 0.09$ ;  $p < 0.76$ ]. Por lo tanto, se incluyeron los datos de todos los animales en los restantes análisis estadísticos.

#### **DATOS PRE-QUIRÚRGICOS (LÍNEA BASE)**

##### **Ingesta de Comida Sólida a L.P (Línea Base)**

Los datos fueron analizados usando un ANOVA. Los resultados mostraron que no existían diferencias estadísticamente significativas en la Ingesta de Comida Sólida a L.P. entre el Grupo Capsaicinado y su control grupos un día antes de la operación quirúrgica [ $F(1, 20) = 0.25$ ,  $p < 0.61$ ].

##### **Pesos Corporales**

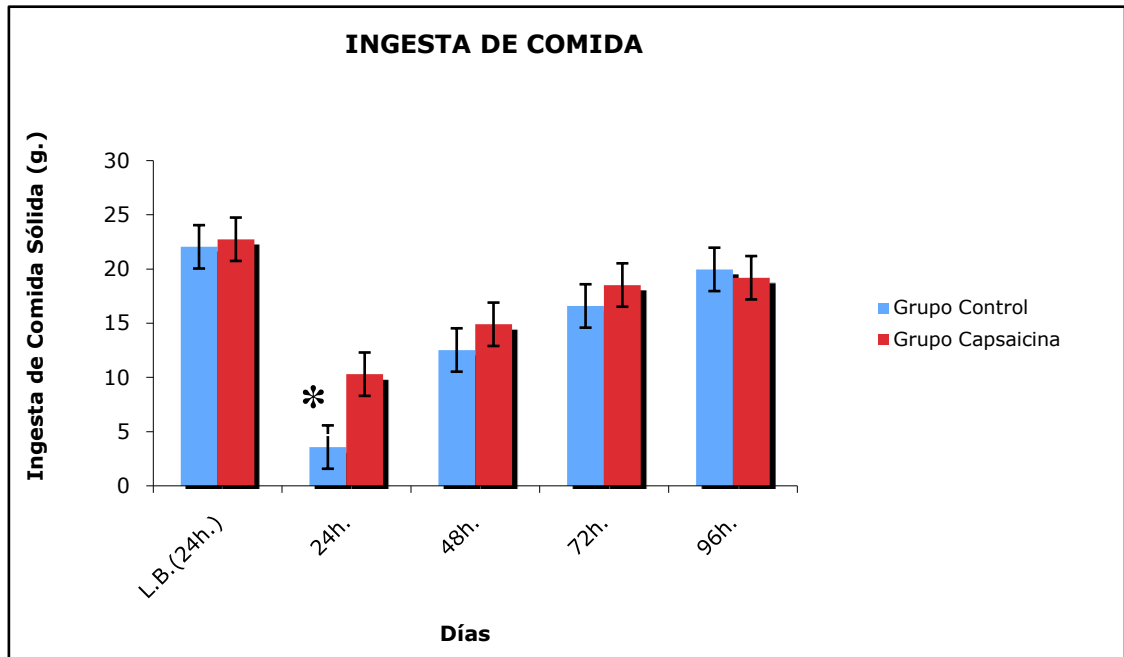
No se mostraron diferencias entre los grupos en el peso corporal antes de la cirugía vagal [ $F(1, 20) = 1.07$ ,  $p < 0.31$ ].

#### **DATOS POST-QUIRÚRGICOS**

##### **Ingesta de Comida Sólida a L.P.**

Los datos fueron analizados usando un ANOVA de dos vías (grupo x sesiones) con medidas repetidas. De acuerdo con esta ANOVA, los efectos de las sesiones [ $F(3, 60) = 88.49$ ,  $p < 0.001$ ] y la interacción grupo x sesiones [ $F(3, 60) = 6.89$ ,  $p < 0.001$ ] fueron estadísticamente significativo. Por su parte, la ingesta de Comida Sólida a L.P. de los dos grupos en cada sesión individual (ANOVA de una vía) mostró una mayor ingesta del Grupo Capsaicinado durante las 24 h. posteriores a la cirugía [ $F(1, 20) = 15.16$ ;  $p < 0.001$ ], algo que no sucede a las 48 [ $F(1, 20) = 2.13$ ,  $p < 0.159$ ], 72 [ $F(1, 20) = 0.99$ ,  $p < 0.329$ ] y 96 h. post-operatorias [ $F(1, 20) = 0.35$ ;  $p < 0.560$ ] (Gráfica 3.1).





**Gráfica 3.1:** Ingesta de Comida Sólida a Largo Plazo del Grupo Capsaicinado y su Control a las 24, 48, 72 y 96 h. post-operatorias.

### Ingesta de Comida Líquida a C.P.

El análisis estadístico reveló que los grupos mostraban diferencias significativa a lo largo de las sesiones [ $F(2, 40) = 54.52, p < 0.001$ ], pero no con respecto a la interacción grupo x sesiones [ $F(2, 40) = 0.07, p < 0.92$ ]. No se observan diferencias significativas entre los grupos en el caso de la Ingesta de Comida Líquida (Sacarosa 10%) a C.P., ni a los 15 min. [ $F(1, 20) = 2.13, p < 0.159$ ], ni a los 30 min. [ $F(1, 20) = 2.13, p < 0.159$ ] y ni a los 60 min. [ $F(1, 20) = 2.13, p < 0.159$ ] de haberles presentado la comida tras un periodo de privación de agua y comida de 24 h.

### Ingesta de Comida Líquida a L.P.

El ANOVA llevado a cabo en este apartado mostró que los grupos no presentaban diferencias estadísticamente significativas en la Ingesta de Comida Líquida (Sacarosa 10%) a L.P. [ $F(1, 20) = 0.12, p < 0.72$ ].

### Ingesta de Comida Sólida a C.P.

Los datos fueron analizados usando un ANOVA de dos vías (grupo x sesiones) con medidas repetidas. De acuerdo con esta ANOVA, el efecto de las sesiones fue estadísticamente significativo [ $F(2, 40) = 46.49, p < 0.000$ ], pero no la interacción grupo x sesiones [ $F(2, 40) = 0.65, p < 0.52$ ]. El análisis (ANOVA de una vía) de la

ingesta de Comida Sólida a C.P. de los dos grupos en cada sesión individual mostró que no existían diferencias ni a los 30 min. [ $F(1, 20) = 0.85, p < 0.36$ ], ni a los 60 min. [ $F(1, 20) = 0.68, p < 0.41$ ] y ni a los 90 min. [ $F(1, 20) = 2.20, p < 0.15$ ] de haberles presentado a los animales la comida sólida después de un estado de privación de comida de 24 h.

## **- GRUPO 2 (Animales lesionados en el PBl):**

### **DATOS PRE-QUIRÚRGICOS (LÍNEA BASE)**

#### **Ingesta de Comida Sólida a L.P**

Los datos analizados usando un ANOVA mostraron que no existían diferencias estadísticas entre el grupo de animales lesionados en el PBl y su control en lo referido a la Ingesta de Comida Sólida a L.P. un día antes de la operación quirúrgica [ $F(1, 16) = 0.03, p < 0.84$ ].

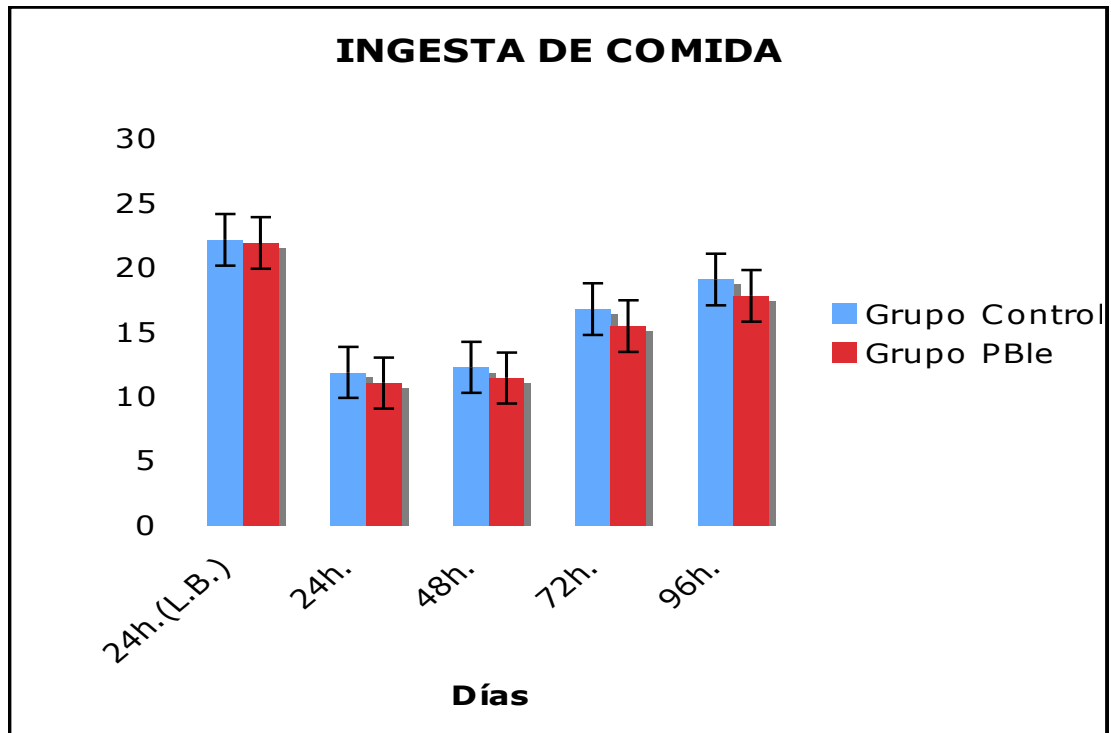
#### **Pesos Corporales**

No se mostraron diferencias entre los grupos en el peso corporal antes de la cirugía vaginal [ $F(1, 16) = 0.48; p < 0.49$ ].

### **DATOS POST-QUIRÚRGICOS**

#### **Ingesta de Comida Sólida a L.P.**

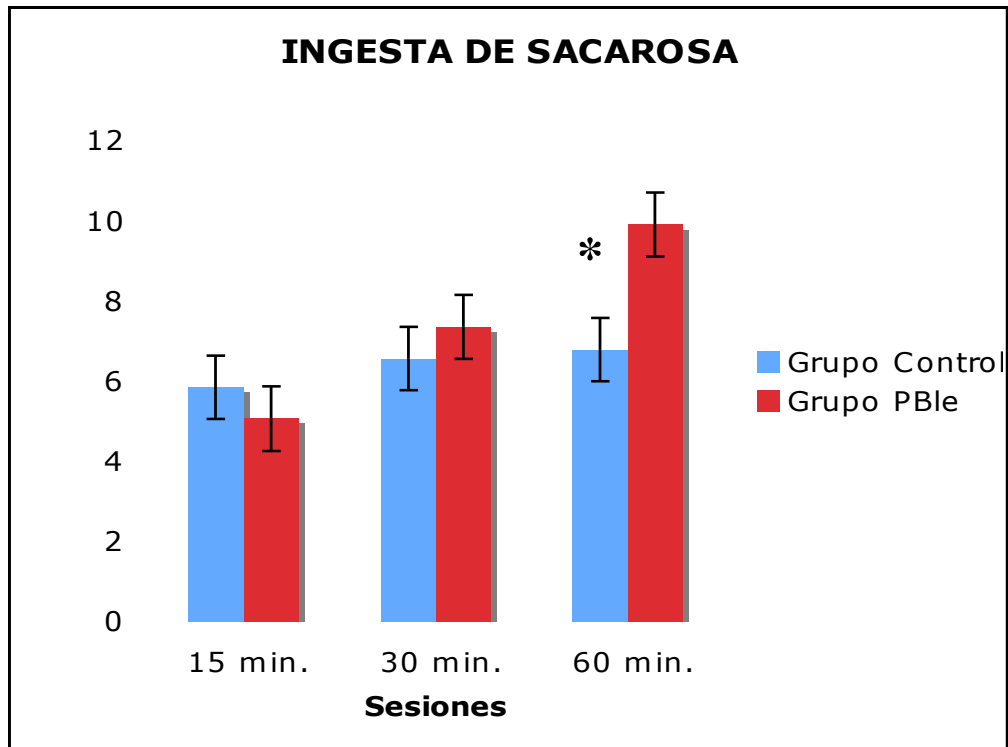
Los datos fueron analizados usando un ANOVA de dos vías (grupo x sesiones) con medidas repetidas. De acuerdo con esta ANOVA, los efectos de las sesiones fueron estadísticamente significativo [ $F(3, 48) = 16.66, p < 0.001$ ] pero no el de la interacción grupo x sesiones [ $F(3, 48) = 0.026, p < 0.99$ ]. El análisis (ANOVA de una vía) de la ingesta de Comida Sólida a L.P. de los dos grupos en cada sesión individual, mostró que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos a las 24 [ $F(1, 16) = 0.08; p < 0.77$ ], 48 [ $F(1, 16) = 0.08, p < 0.77$ ], 72 [ $F(1, 16) = 0.16, p < 0.69$ ] y 96 h. post-operatorias [ $F(1, 16) = 0.13; p < 0.71$ ] (Gráfica 3.2).



**Gráfica 3.2:** Ingesta de Comida Sólida a Largo Plazo del Grupo PBl e su Control a las 24, 48, 72 y 96 h. post-operatorias.

### Ingesta de Comida Líquida a C.P.

El análisis estadístico de la ingesta de Comida Líquida a los 15, 30 y 60 min. después de haberles presentado la Sacarosa (10%) reveló que los grupos mostraban diferencias significativa tanto en las sesiones [ $F(2, 32) = 34.44$ ;  $p < 0.001$ ], como en la interacción grupo x sesiones [ $F(2, 32) = 15.89$ ;  $p < 0.000$ ]. El análisis individual mostró que los sujetos con lesión del PBl ingerían una mayor cantidad de Sacarosa en una prueba de 60 min. tras un periodo de privación de agua y comida de 24 h. [ $F(1, 16) = 4.77$ ;  $p < 0.04$ ], pero no existían diferencias significativas entre los grupos ni a los 15 min. [ $F(1, 16) = 0.46$ ;  $p < 0.50$ ] ni a los 30 min. [ $F(1, 16) = 0.29$ ;  $p < 0.59$ ] de haberles presentado dicha comida líquida (Gráfica 3.3).



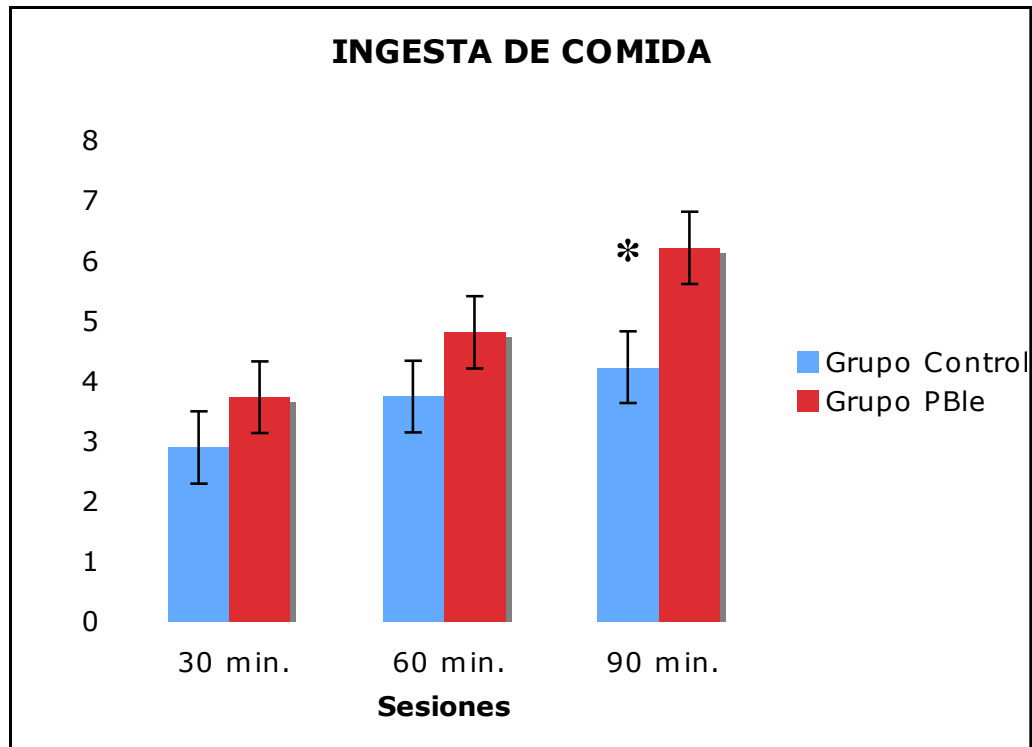
**Gráfica 3.3:** Ingesta de Comida Líquida (Sacarosa 10%) a Corto Plazo del Grupo con lesión electrolítica bilateral del PBle y su control a los 15, 30 y 60 min. de su presentación tras un periodo de privación de comida y agua de 24 h.

### Ingesta de Comida Líquida a L.P.

El ANOVA mostró que los grupos no mostraban diferencias estadísticamente significativas en la Ingesta de Comida Líquida (Sacarosa 10%) a L.P. (prueba de 24 h.) [ $F(1, 16) = 0.001, p < 0.97$ ].

### Ingesta de Comida Sólida a C.P.

Los datos fueron analizados usando un ANOVA de dos vías (grupo x sesiones) con medidas repetidas. De acuerdo con esta ANOVA, el efecto de las sesiones fue estadísticamente significativo [ $F(2, 32) = 15.10; p < 0.000$ ], pero no la interacción grupo x sesiones [ $F(2, 32) = 1.55; p < 0.22$ ]. El siguiente análisis (ANOVA de una vía) de la ingesta de Comida Sólida a C.P. de los dos grupos en cada sesión individual mostró que aunque no existían diferencias ni a los 30 min. [ $F(1, 16) = 2.62; p < 0.12$ ], ni a los 60 min. [ $F(1, 16) = 3.36; p < 0.08$ ] de haberles presentado a los animales la comida sólida después de un estado de privación de comida de 24 h., los animales con lesión del PBle consumían una mayor cantidad de comida sólida que sus controles en la prueba de 90 min. [ $F(1, 16) = 5.18, p < 0.03$ ] (Gráfica 3.4).



**Figura 3.4:** Ingesta de Comida Sólida a Corto Plazo del Grupo con lesiones electrólíticas del PLe y su Control a los 30, 60 y 90 min. de su presentación tras un periodo de privación de comida de 24 h.

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente experimento muestran que la Vagotomía mediante Capsaicina da lugar a un aumento de la Ingesta de Comida Sólida (Panlab, S.L.) en las primeras 24 h., pero no a las 48, 72 y 96 h., después de la operación quirúrgica (Zafra *et al.*, 2003, 2004). Sin embargo, todas las demás modalidades de ingesta analizadas (tanto de Comida Sólida como Líquida a C. y a L.P.) no mostraron diferencias entre el grupo Capsaicinado y su control. Estos datos confirman que el efecto de la Capsaicina perivagal sobre la Ingesta con alimentos familiares se observa únicamente durante el primer día postquirúrgico.

Dado que el tratamiento con Capsaicina fue administrado perivagalmente y se trata de una neurotoxina que afecta selectivamente a las aferencias viscerales primarias (Hölzer, 1991; Ritter y Dinh, 1992), se puede proponer que los cambios en la Ingesta de Comida fueran debidos al daño de las fibras aferentes vagales producidos por la Capsaicina. En efecto, parece bien establecido que el Nervio Vago participa en el control de la Ingesta de Comida a C.P. (Saciación) (Snowdon y Epstein, 1970; Mordes *et al.*, 1979; González y Deutsch, 1981; Davis *et al.*, 1994; Phillips y Powley, 1998; Furness *et al.*, 2001; Date *et al.*, 2002; Zafra *et al.*, 2003, 2004),

por lo que es posible que la Capsaicina al haber interrumpido los mecanismos vagales implicados en la regulación de la Saciación haya implicado una reducción en dichas señales que posteriormente habría compensado otra vía neurobiológica (Zafra *et al.*, 2003).

De hecho, la normalización de la ingesta de comida diaria total de los animales capsaicinados después de la primera exposición post-quirúrgica de la dieta sería debido a factores independientes de la vía vagal (por ejemplo, Saciedad Condicionada) o como resultado de la participación de otras vías vagales no afectadas por el tratamiento con Capsaicina. Con respecto a esta última posibilidad, se sabe que existen fibras vagales resistentes a la Capsaicina en el tracto gastrointestinal de las ratas (Berthoud *et al.*, 1997). Esas fibras son principalmente fibras sensibles a la distensión que inervan el esófago y el trato gastrointestinal superior (Berthoud *et al.*, 1997; Berthoud y Neuhuber, 2000), siendo la distensión gástrica un mecanismo ampliamente propuesto de la interrupción de la ingesta en el comportamiento alimenticio (González y Deutsch, 1981; Phillips y Powley, 1996, 1998; Rolls *et al.*, 1998). Así, este componente u otros que son resistentes a la Capsaicina de alguna manera participarían en el efecto compensatorio posterior. Sin embargo, ya que este efecto es también observado en cierto grado en animales completamente vagotomizados (Phillips y Powley, 1998), en la siguiente regulación de la ingesta también estarían implicados mecanismos que son independientes del Nervio Vago (por ejemplo, vía humoral) (Zafra *et al.*, 2003).

Por su parte, los animales del Grupo 2 (lesión del PBle) del presente experimento no mostraban diferencias en la ingesta de comida sólida con respecto a sus controles (lesión ficticia) a las 24 h. postquirúrgicas, por lo que podría parecer que el centro donde proyecta la información vagal viscerosensorial (PBle) no estuviese implicado en el proceso de Saciación. Sin embargo, los animales con lesiones del PBle consumieron una mayor cantidad de Comida Líquida y Sólida a Corto Plazo que sus controles en pruebas de ingesta de 60 y 90 min., respectivamente, tras un periodo de privación de comida de 24 horas. Por lo tanto, el periodo de duración de la prueba de ingesta parece relevante, mostrándose hiperfagia en los animales con lesiones del PBle en pruebas de poca duración (60 y 90 min.) y desapareciendo dichas diferencias en pruebas de larga duración (24 h.).

Estos datos son compatibles con la idea comentada anteriormente de la existencia de mecanismos compensatorios que habrían actuado en las pruebas de

ingesta de larga duración (24 h.), por ejemplo, factores independientes de la vía vagal (por ejemplo, Saciedad Condicionada) o como resultado de la participación de otras vías vagales y no vagales (por ejemplo, nervios espinales viscerales del sistema simpático) que proyecten hacia otros núcleos cerebrales distintos del PBle. Sin embargo, de acuerdo con los datos obtenidos en el Experimento 5, se descarta la posibilidad de la participación de la vía humoral en este efecto compensatorio, ya que, si así fuese, los animales con lesiones del PBle no deberían haber mostrado el efecto hiperfágico en las pruebas de ingesta a los 60 y 90 min., tiempo suficiente para que hubiesen actuado los procesos de absorción y la consiguiente activación de estructuras cerebrales.

Los restantes análisis de Ingesta, tanto de Comida Sólida como Líquida a Corto y Largo Plazo, no encuentran diferencias entre los animales con lesiones del PBle y sus controles.

Existen numerosos estudios neuroanatómicos que indican que el PBle es un importante relevo de información viscerosensorial y nociceptiva vagal (Herbert *et al.*, 1990; Moga *et al.*, 1990; Bernard *et al.*, 1993; Krout y Loewy, 2000; De Gobbi *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2004), observándose un efecto hiperfágico tras la lesión general del PBl (que aparentemente incluye al PBle) (Takaki *et al.*, 1990; Zafra *et al.*, 2005). Es posible, por tanto, que el PBle pueda estar implicado en los procesos de control de la Ingesta de Comida a C.P. y que su lesión pueda aumentar dicha ingesta al bloquear las señales viscerosensoriales vagales necesarias para este proceso de Saciación.

En conclusión, los estudios presentados en el presente experimento demuestran que la administración perivagal de Capsaicina induce una mayor ingesta de comida sólida en las primeras presentaciones después de la cirugía, pero no después. Dado los efectos neurotóxicos de la Capsaicina, se propone que los efectos potenciadores sobre la ingesta están mediados por el sistema sensorial vagal y la compensación posterior de dicho efecto por otros sistemas (por ejemplo, vías espinales viscerales, Saciedad Condicionada, Sistema Humoral, etc.) o por vías vagales resistentes a la Capsaicina (por ejemplo, vías sensibles a la distensión del tracto gastrointestinal). Por otra parte, se demuestra que la lesión del PBle produce un aumento en la ingesta de Comida Sólida y Líquida a C.P. por ser el sustrato neural encargado de procesar las señales viscerosensoriales vagales necesarias para el proceso de Saciación.

## **EXPERIMENTO 6: Efecto de las lesiones del Núcleo Parabraquial Lateral Externo (PBLE) sobre la Re-Ingesta de Comida después de la Extracción Parcial de Contenidos Nutritivos Gástricos.**

Parece bien establecido en la bibliografía sobre nutrición que en los casos en los que la ingesta de comida no es depositada en el estómago (Alimentación Ficticia) o es retirada de la cavidad gástrica, se produce la re-ingesta compensatoria (Snowdon, 1970; Davis y Campbell, 1973; Deutsch *et al.*, 1978; Wirth y McHugh, 1983; Kaplan *et al.*, 1994). Al finalizar una ingesta la mayor parte de la comida permanece en el tracto gastrointestinal y particularmente en el estómago (McHugh *et al.*, 1975), por lo que se ha supuesto que el cese de ésta (Saciación a Corto Plazo) es dependiente de alguna señal de origen gástrico como puede ser, por ejemplo, la distensión gástrica producida por la acumulación de nutrientes (Davis y Campbell, 1973; Kraly y Smith, 1978; Wirth y McHugh, 1983).

Esta relevancia gástrica en los procesos de Saciación a Corto Plazo deriva en buena parte de dos procedimientos experimentales: que manipulan el Vaciado Gástrico o provocan Oclusiones del Píloro. En primer caso los animales son sometidos a una extracción parcial de comida desde el estómago una vez que éstos han alcanzado el estado de Saciedad. Habitualmente estos animales compensan e ingieren prácticamente la misma cantidad retirada (Snowdon, 1970; Davis y Campbell, 1973; Deutsch *et al.*, 1978; Wirth y McHugh, 1983; Kaplan *et al.*, 1994).

Por su parte, los procedimientos que actúan sobre el esfínter del Píloro (ocluyéndolo) han observado que el volumen de la ingesta de nutrientes es similar cuando el Píloro es cerrado que cuando se desarrollan los procesos normales de vaciado gástrico (Deutsch *et al.*, 1978; Kraly y Smith, 1978; Wirth y McHugh, 1983).

Estos resultados sugieren que la información visceral originada en el estómago parece ser necesaria y suficiente para regular los procesos de alimentación a Corto Plazo (Davis y Campbell, 1973; Deutsch *et al.*, 1978; Kraly y Smith, 1978; Wirth y McHugh, 1983) y, dentro de estos índices sensoriales, la distensión gástrica parece ocupar un lugar relevante (Davis y Campbell, 1973; Deutsch *et al.*, 1978; Deutsch, 1990).

Alternativamente, otros autores han puesto en tela de juicio este planteamiento (McHugh y Moran, 1978; Gibbs *et al.*, 1981) destacando los efectos Post-Gástricos al comprobar cómo las infusiones intraduodenales de nutrientes o algunas de las



hormonas intestinales reducen la ingesta de alimentos. No puede descartarse, sin embargo, que muchas de estas manipulaciones post-gástricas reducen la ingesta más por su carácter afisiológico, causante de malestar para el animal, que por su acción estrictamente nutritiva (Deutsch, 1985; Wirth y McHugh, 1983).

Finalmente, las ideas propuestas por el grupo de Kaplan y asociados proponen que los mecanismos responsables de la Saciación a Corto Plazo podrían implicar tanto señales de origen gástrico como post-gástrico. Esta propuesta se basa en el hecho de que durante la ingesta los alimentos pasan por un vaciado gástrico natural que podrían originar simultáneamente señales post-gástricas (Kaplan *et al.*, 1992) y que, junto con las señales gástricas, desencadenarían el proceso regulatorio de Saciación a Corto Plazo (Wirth y McHugh, 1983; Kaplan *et al.*, 1994).

A partir de los datos del Experimento 5 de la presente Tesis Doctoral y de otros estudios previos (Ritter *et al.*, 1994; Bernard *et al.*, 1993; Calingasan y Ritter, 1993; Suemori *et al.*, 1994; Baird *et al.*, 2001a, b), se puede proponer que aparentemente el PBle podría formar parte de los sistemas neurales implicado en los procesos de control de la ingesta de alimentos a Corto Plazo, al ser un centro neural donde convergen buena parte de la información viscerosensorial vagal que se requiere para el proceso de Saciación. En este sentido, lesiones en esta región podrían apoyar esta posibilidad ante el efecto hiperfágico a Corto Plazo que se produce tras la lesión del PBl (que puede incluir al PBle) (Takaki *et al.*, 1990; Zafra *et al.*, 2005) y, específicamente, del PBle (Grupo 2 del Experimento 5, presente Tesis Doctoral). Más aún, existe evidencia neurofisiológica que demuestra la activación, entre otras, de las neuronas del PBle ante la distensión gástrica (Suemori *et al.*, 1994; Baird *et al.*, 2001a, b; Berthoud *et al.*, 2001; Vrang *et al.*, 2003; Mazda *et al.*, 2004).

De acuerdo con estos resultados experimentales, el presente estudio pretende examinar la implicación del PBle en los procesos de Saciación a Corto Plazo utilizando el procedimiento de extracción parcial de los nutrientes gástricos en animales que previamente habían sido alimentados con una dieta líquida consumida hasta manifestar un comportamiento de Saciación (5 minutos sin comer). En este experimento se puede hipotetizar que la lesión del PBle podría deteriorar la ingesta compensatoria, esto es, la re-ingesta que previsiblemente suele provocar la extracción de nutrientes desde el estómago. Se asumiría, por lo tanto, que este núcleo troncoencefálico podría desempeñar una función de relevo en la información

viscero-sensorial vagal originada por la distensión gástrica responsable en última estancia de los procesos de Saciación a Corto Plazo.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

### **SUJETOS**

Se utilizaron 24 ratas Wistar con un peso corporal medio de 293.2 g. al principio del experimento. Durante el proceso experimental se eliminaron 2 animales debido al desprendimiento de los catéteres intragástricos. Los 22 animales restantes fueron aleatoriamente asignados a dos grupos: un Grupo con lesión del PBle (n=12) y un Grupo Control con lesión ficticia (n=10).

Todos los animales fueron alojados individualmente en jaulas de metacrilato de 30x15x30 y fueron mantenidos en unas condiciones de temperatura de entre 22°-25°, con ciclos de luz-oscuridad de 12:12 horas y con libre acceso a agua y comida (Panlab, S.L., Barcelona).

### **PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO**

#### **a) Implante de un catéter intragástrico:**

El implante de la sonda intragástrica en este experimento se ha realizado de manera análoga a la descrita en el Capítulo I de la presente Tesis Doctoral.

#### **b) Lesión electrolítica bilateral del PBle:**

La lesión electrolítica bilateral del PBle así como la lesión ficticia efectuada en los animales controles se realizaron también siguiendo las mismas condiciones descritas para el Grupo 2 (Lesión del PBle) del Experimento 5 de la presente Tesis Doctoral.

### **PROCEDIMIENTO COMPORTAMENTAL**

#### **A) Fase I (Preparatoria):**

Tras un periodo de adaptación de 5 días a las condiciones del laboratorio se cuantifica el peso los animales y a continuación se les retira la comida y el agua que hasta entonces se había mantenido en una situación *ad libitum*.

Durante los cuatro días posteriores los animales son habituados a consumir una dieta a base de leche con chocolate que ofrecida mediante una bureta. El peso de los animales era medido cada uno de los días al comienzo de cada sesión. Durante los

dos primeros días la dieta líquida era ofrecida en dos sesiones de 30 minutos cada una y separadas por un intervalo de una hora. El 3º y 4º día se ofrece el alimento sólo en una sesión de 20 minutos.

También durante los tres primeros días y al finalizar cada sesión, los animales disponen de agua durante 10 minutos así como de alimento sólido (Panlab, S.L., Barcelona) (7,5 g. los dos primeros días y 10 g. el día 3º). En el 4º día, y una vez retirada la dieta, se les ofrece comida sólida y agua *ad libitum*; la cantidad consumida de la primera de ella sería cuantificada al día siguiente (24 horas después).

El 5º y 6º día se procede de la misma manera a la descrita para el día 4º.

El 7º día, una vez pesados los animales y cuantificada la ingesta de comida sólida del día anterior, se procede a realizar sucesivamente la cirugía central y periférica. Inmediatamente después se les ofrece alimento sólido y agua *ad libitum*. Seis horas después de la cirugía, se cuantifica la ingesta de comida sólida.

Durante los tres días siguientes se procede de la misma manera, es decir, una vez pesados los animales y se cuantifica la ingesta sólida, esto es, a las 24, 48 y 72 horas. Al final del último día de éstos y después de registrar la ingesta de comida sólida, se les retira el agua y la comida.

El 11º día, y una vez pesados los animales, se les presenta de nuevo una bureta con la dieta líquida en tres sesiones (a las 10:00 h., 13:00 h. y 17:00 h.), permitiéndoles alimentarse hasta alcanzar el criterio de Saciación, esto es, permaneciendo 5 minutos sin nuevas ingestas. A continuación se les ofrece agua durante 10 minutos.

A lo largo de los dos días siguientes y después de cuantificar los pesos de los animales se les ofrece el alimento líquido sólo una vez hasta que alcancen el criterio de Saciación.

## **B) Fase II (Experimental):**

Esta fase experimental, propiamente dicha, se divide a su vez en tres subfases organizadas bajo un diseño intrasujeto ABA (extracción intragástrica, no extracción i.g. y extracción i.g.):

**a) Subfase A<sub>1</sub>:**

El día 14º, se les ofrece a los animales la bureta con la dieta líquida hasta alcanzar el criterio de Saciación (5 minutos sin alimentarse). Inmediatamente después se procede a la extracción gástrica de nutrientes a través de la fístula intragástrica, 1/3 de la cantidad de nutriente consumida, cuantificándose lo ingerido a los 5, 10, 15 y 20 minutos. Transcurridas 5 horas se les ofrece de nuevo el alimento durante 30 minutos y agua durante los 10 minutos siguientes.

**b) Subfase B:**

El día 15º se lleva a cabo el mismo procedimiento del día anterior (Subfase A<sub>1</sub>), con la diferencia de que no se realiza ninguna extracción del contenido gástrico.

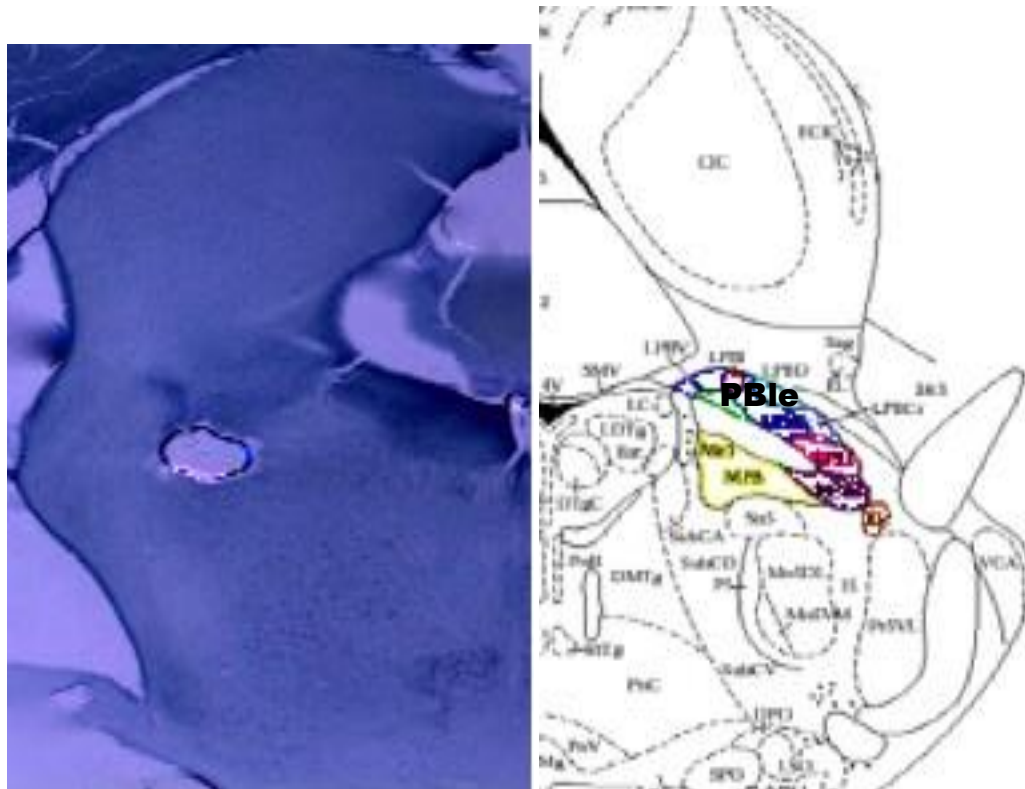
**c) Subfase A<sub>2</sub>:**

El día 16º, último día del experimento, se sigue el mismo procedimiento que se había llevado a cabo durante la Subfase A<sub>1</sub>.

## **HISTOLOGÍA**

Una vez finalizado el experimento, todos los animales lesionados en el PBlc fueron profundamente anestesiados con Tiopental sódico (80 mg/Kg, ABBOTT, Madrid) y perfundidos intracardiamente con formaldehído (10%). Los cerebros fueron extraídos y conservados en formaldehído al 10% durante al menos 48 horas.

Las lesiones electrolíticas fueron identificadas y localizadas a través de distintas secciones coronales, teñidas con Violeta de Cresilo y examinadas con un microscopio óptico (Olympus, CO 11) (Fotografía 3.2).



**Fotografía 3.2:** Localización anatómica de la lesión electrolítica del PBle, tomando como referencia el atlas neuroanatómico de Paxinos y Watson (1986).

## RESULTADOS

### A) Fase I(Preparatoria):

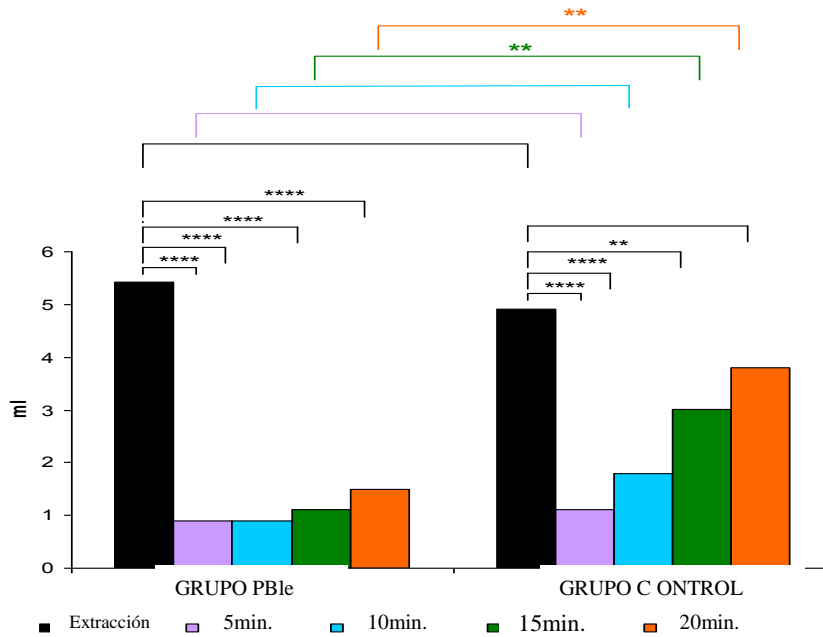
Los datos de la Ingesta de Comida y Peso Corporal antes de la Operación Quirúrgica se analizaron mediante un ANOVA, mostrando que no existen diferencias entre los grupos ni en las cantidades diarias ingeridas de Leche con Chocolate [ $F(1, 20) = 0.096$ ;  $p < 0.75$ ], ni de Comida Sólida [ $F(1, 20) = 2.55$ ;  $p < 0.12$ ], ni en los Pesos Corporales [ $F(1, 20) = 0.54$ ;  $p < 0.47$ ].

Por otro lado, el análisis estadístico reveló que días después de la operación quirúrgica y previo a la realización de la fase experimental propiamente dicha tampoco existían diferencias significativas entre los grupos ni en las cantidades ingeridas de Leche con Chocolate [ $F(1, 20) = 2.17$ ;  $p < 0.15$ ], ni de Comida Sólida [ $F(1, 20) = 1.68$ ;  $p < 0.2$ ], ni en los Pesos Corporales [ $F(1, 20) = 3.24$ ;  $p < 0.08$ ].

### B) Fase II (Experimental):

#### a) Subfase A<sub>1</sub>:

Los resultados de esta fase experimental se muestran en la Gráfica 3.6:



**Grafica 3.6:** Re-ingesta de alimento líquido tras la extracción parcial de contenido nutritivo gástrico en el grupo lesionado bilateralmente en el PBlE y en su Control en la Fase A1 del experimento.

Los datos de la Fase A1 del presente experimento se analizaron utilizando un ANOVA con medidas repetidas. Este análisis revela que existen diferencias estadísticamente significativas en la variable Grupo [ $F(1, 20) = 4.78$ ;  $p < 0.04$ ], en la variable Tiempo [ $F(3, 60) = 15.82$ ;  $p < 0.001$ ] y en la interacción Grupo x Tiempo [ $F(3, 60) = 6.61$ ;  $p < 0.001$ ].

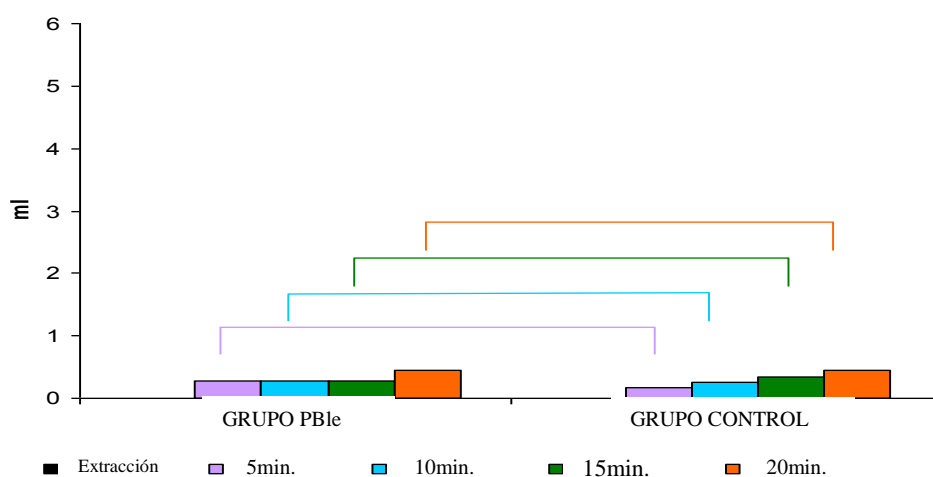
El análisis individual de los grupos permite observar que el Grupo Control muestra diferencias significativas entre la ingesta inicial y a lo largo de los 20 minutos de re-ingesta [ $F(4, 36) = 13.36$ ;  $p < 0.001$ ]. Existen diferencias entre la cantidad del contenido gástrico extraído y lo re-ingerido a los 5 min. [ $F(1, 9) = 118.79$ ;  $p < 0.001$ ], 10 min. [ $F(1, 9) = 24.40$ ;  $p < 0.001$ ] y a los 15min. [ $F(1, 9) = 7.26$ ;  $p < 0.02$ ]. Sin embargo, estas diferencias se anulan a los 20 min. de re-ingesta [ $F(1, 9) = 1.45$ ;  $p < 0.25$ ], en los que el Grupo Control re-ingiere una cantidad de alimento similar al contenido gástrico extraído.

El grupo lesionado, por su parte, muestra diferencias estadísticamente significativas a lo largo de de los 20 min. de re-ingesta [ $F(4, 44) = 106.43$ ;  $p < 0.001$ ]. Estas diferencias significativas ocurren a los 5 min. [ $F(1, 11) = 216.04$ ;  $p < 0.001$ ], 10 min. [ $F(1, 11) = 210.96$ ;  $p < 0.001$ ], 15 min. de re-ingesta [ $F(1, 11) = 148.63$ ;  $p < 0.001$ ] y 20 min. [ $F(1, 11) = 104.63$ ;  $p < 0.001$ ].

El análisis estadístico entre Grupos mostró que no existían diferencias ni en la latencia para empezar a ingerir la dieta de Batido [ $F(1, 20) = 0.62$ ;  $p < 0.43$ ] ni en el tiempo empleado en ingerir este alimento hasta llegar al criterio de Saciación [ $F(1, 20) = 0.22$ ;  $p < 0.63$ ]. Tampoco existen diferencias en las cantidades ingeridas inicialmente por ambos grupos (criterio de Saciación) [ $F(1, 20) = 1.72$ ;  $p < 0.20$ ] ni tampoco, por ende, en las cantidades extraídas (1/3 de lo ingerido) transcurridos los 5 min. del criterio de Saciación [ $F(1, 20) = 1.64$ ;  $p < 0.21$ ]. Tampoco se produjeron diferencias en las cantidades re-ingерidas por ambos grupos ni a los 5 min. [ $F(1, 20) = 0.21$ ;  $p < 0.65$ ] ni a los 10 min. [ $F(1, 20) = 2.17$ ;  $p < 0.15$ ], aunque sí se produjeron a los 15 min. [ $F(1, 20) = 6.95$ ;  $p < 0.01$ ] y a los 20 min. [ $F(1, 20) = 6.88$ ;  $p < 0.01$ ].

### b) Subfase B:

Los resultados de esta fase experimental se muestran en la Gráfica 3.7:



**Gráfica 3.7:** Re-ingesta de alimento líquido tras la extracción parcial del contenido gástrico nutritivo en el grupo lesionado bilateralmente en el PBlе y en su Control en la Fase B del experimento.

Al igual que en la fase anterior, los datos de la Fase B del presente experimento fueron analizados utilizando un ANOVA con medidas repetidas. Este análisis reveló que si bien se producen diferencias estadísticamente significativas en la variable Tiempo [ $F(3, 60) = 2.81$ ;  $p < 0.04$ ], no ocurre lo mismo

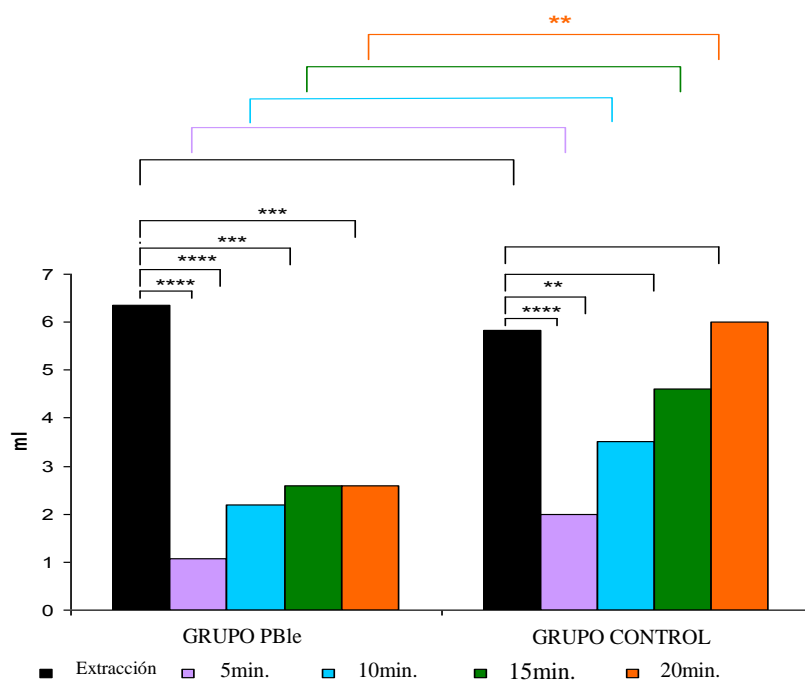
ni en la variable Grupo [ $F(1, 20) = 0.001$ ;  $p < 0.96$ ] ni en la interacción Grupo x Tiempo [ $F(3, 60) = 0.36$ ;  $p < 0.78$ ].

El análisis individual de los grupos permite observar que en el caso del Grupo Control no aparecen diferencias significativas a lo largo de los 20 min. del periodo de re-ingesta [ $F(4, 36) = 1.90$ ;  $p < 0.13$ ], aunque sí se producen en el Grupo Lesionado [ $F(4, 44) = 2.76$ ;  $p < 0.03$ ].

El análisis estadístico de las diferencias entre Grupos demostró que éstas no se producen con discrepancias ni en las cantidades ingeridas inicialmente por ambos grupos (criterio de Saciación) [ $F(1, 20) = 2.19$ ;  $p < 0.15$ ] ni tampoco en las cantidades ingeridas en ambos grupos en los posteriores 5 min. [ $F(1, 20) = 0.20$ ;  $p < 0.65$ ], 10 min. [ $F(1, 20) = 0.009$ ;  $p < 0.92$ ], 15 min. [ $F(1, 20) = 0.06$ ;  $p < 0.80$ ] y 20 min. [ $F(1, 20) = 0.00$ ;  $p < 1.00$ ]. Tampoco existen diferencias entre grupos ni en la latencia de ingesta [ $F(1, 20) = 0.13$ ;  $p < 0.71$ ], ni en el tiempo dedicado a la ingesta [ $F(1, 20) = 0.44$ ;  $p < 0.51$ ], ni en la cantidad de Batido ingerido [ $F(1, 20) = 2.19$ ;  $p < 0.15$ ].

### c) Subfase A2:

Los resultados de esta fase experimental se muestran en la Gráfica 3.8:



**Gráfica 3.8:** Re-ingesta de dieta líquida después de la extracción parcial de contenido nutritivo gástrico en el grupo lesionado bilateralmente en el PBlE y en su Control en la Fase A2 del experimento.



Al igual que en las dos fase anteriores del presente experimento, los datos de la Fase A2 se analizaron utilizando un ANOVA con medidas repetidas. Este análisis muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas en la variable Grupo [ $F(1, 20) = 2.37$ ;  $p < 0.13$ ], pero sí en la variable Tiempo [ $F(3, 60) = 23.1$ ;  $p < 0.001$ ] y en la interacción Grupo x Tiempo [ $F(4, 80) = 4.66$ ;  $p < 0.003$ ].

El análisis individual de los grupos permite comprobar que el Grupo Control muestra diferencias significativas entre la ingesta inicial y a lo largo de los 20 minutos de re-ingesta [ $F(4, 36) = 12.22$ ;  $p < 0.001$ ]. Estas diferencias entre la cantidad del contenido gástrico extraído y lo re-ingerido se producen a los 5 min. [ $F(1, 9) = 42.17$ ;  $p < 0.001$ ] y a los 10 min. [ $F(1, 9) = 7.25$ ;  $p < 0.02$ ], pero no a los 15 min. [ $F(1, 9) = 1.27$ ;  $p < 0.28$ ] ni a los 20 min. de re-ingesta [ $F(1, 17) = 0.003$ ;  $p < 0.86$ ].

Por el contrario, el Grupo Lesionado del PBle muestra diferencias estadísticamente significativas entre la ingesta inicial y los 20 min. de re-ingesta [ $F(4, 44) = 18.81$ ;  $p < 0.001$ ]. Estos animales muestran diferencias estadísticamente significativas en todos los intervalos de medida: a los 5 min. [ $F(1, 11) = 55.57$ ;  $p < 0.001$ ], 10 min. [ $F(1, 11) = 25.56$ ;  $p < 0.001$ ], 15 min. [ $F(1, 11) = 16.76$ ;  $p < 0.001$ ] y también a los 20 min. de re-ingesta [ $F(1, 11) = 16.76$ ;  $p < 0.001$ ].

El análisis estadístico entre Grupos muestra que no existen diferencias en las cantidades ingeridas inicialmente por ambos grupos (criterio de Saciación) [ $F(1, 20) = 1.45$ ;  $p < 0.24$ ] ni tampoco, por ende, en las cantidades que se les extraía (1/3 de lo ingerido) [ $F(1, 20) = 1.37$ ;  $p < 0.25$ ]. Tampoco se produjeron diferencias en las cantidades re-ingeridas por ambos grupos ni a los 5 min. [ $F(1, 20) = 1.10$ ;  $p < 0.30$ ], ni a los 10 min. [ $F(1, 20) = 1.27$ ;  $p < 0.27$ ], ni a los 15 min. [ $F(1, 20) = 1.96$ ;  $p < 0.17$ ], pero sí a los 20 min. [ $F(1, 20) = 6.85$ ;  $p < 0.01$ ]. Tampoco existen diferencias entre Grupos ni en la latencia [ $F(1, 20) = 0.068$ ;  $p < 0.79$ ], ni en el tiempo dedicado a la ingesta [ $F(1, 20) = 1.58$ ;  $p < 0.22$ ].

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente experimento indican que los animales privados de alimento y lesionados en el PBle ingieren cantidades equivalente de Comida Líquida (Leche con Chocolate) a las consumidas por sus controles, sugiriendo que el PBle no está implicado específicamente en el proceso de Saciación. Sin embargo, las lesiones del PBle alteran el mecanismo compensatorio de re-ingesta

que se produce tras la extracción parcial intragástrica de este alimento en los animales una vez saciados, un fenómeno, por otra parte, bien establecido en la bibliografía de la Nutrición a Corto Plazo (Snowdon, 1970; Davis y Campbell, 1973; Deutsch *et al.*, 1978; Wirth y McHugh, 1983; Kaplan *et al.*, 1994).

Estos resultados apoyan la implicación del PBle en la regulación de los procesos nutritivos a Corto Plazo, probablemente a través de la implicación de este núcleo troncoencefálico en el procesamiento de las señales viscero-sensoriales vagales, apoyando así la idea de que el eje Vagal-PBle puede ser un componente fundamental en la regulación de los procesos nutritivos a Corto Plazo.

En efecto, diversos estudios han comprobado que el PBle es un área cerebral donde terminan las fibras que transmiten la información visceral de carácter quimiosensorial (Bernard *et al.*, 1993). Más aún, tanto la administración intraduodenal de glucosa (Wang *et al.*, 1999) como la inducción de glucoprivación (Ritter *et al.*, 1994) provoca la activación de una serie de estructuras cerebrales entre las que se encuentra el PBle. Esta última activación, por otra parte, que es eliminada mediante Vagotomías (Ritter *et al.*, 1994).

En esta misma línea, existen estudios que han identificado neuronas en el PBle que responderían a la distensión gástrica (Suemori *et al.*, 1994; Baird *et al.*, 2001a, b; Berthoud *et al.*, 2001; Vrang *et al.*, 2003; Mazda *et al.*, 2004), una importante señal sensorial relacionada con los mecanismos implicados en el proceso de Saciación (Davis y Campbell, 1973; Deutsch *et al.*, 1978; Kraly y Smith, 1978; Wirth y McHugh, 1983).

Sin embargo, el hecho de que no existan diferencias entre los animales con lesiones del PBle y sus controles ni en la latencia de ingesta ni en las cantidades consumidas de Comida Líquida hasta cumplir el criterio de Saciación (5 min. sin consumir), parece sugerir que el PBle no esté implicado específicamente en el proceso de Saciación y que, de nuevo, otros mecanismos alternativos podrían ser responsables de dicho efecto compensatorio (por ejemplo, vías vagales y no vagales que proyecten a otro centro cerebral distinto al PBle o Sacidad Condicionada). De hecho, en la subfase B, cuando no se produce extracción alguna de nutrientes tras el criterio de Saciación, las cantidades ingeridas de Comida Líquida entre ambos grupos también es idéntica.

Sin embargo, las lesiones del PBle parecen interferir en la capacidad del animal para ajustar su comportamiento a cambios repentinos en el sistema digestivo, como los producidos tras la extracción de contenidos gástricos.

Con respecto a la controversia planteada en relación con la relevancia de los distintos niveles del sistema gastrointestinal implicados en los procesos nutritivos regulatorios a Corto Plazo, si bien algunos autores destacan las señales gastrointestinales procedentes de niveles post-gástricos (McHugh y Moran, 1978; Gibbs *et al.*, 1981), otros muchos consideran que este proceso de regulación procede particularmente del sistema gástrico (Davis y Campbell, 1973; Deutsch *et al.*, 1978; Kraly y Smith, 1978; Wirth y McHugh, 1983).

Este último punto de vista se ve apoyado por los datos a través de las técnicas de Oclusión Pilórica, mediante las cuales se ha demostrado que los animales ingieren la misma cantidad de nutrientes líquidos cuando el píloro está ocluido (oclusión pilórica) y cuando se producen los procesos habituales de vaciado gástrico (Deutsch *et al.*, 1978; Kraly y Smith, 1978; Wirth y McHugh, 1983; Seeley *et al.*, 1996), demostrando así que las señales que proceden del estómago podrían ser suficientes para regular y determinar el volumen de la ingesta a Corto Plazo.

Los mecanismos neurobiológicos implicados durante la extracción parcial de nutrientes debe suponer la activación de componentes especializados en la detección rápida de la información visceral. En este sentido, está ampliamente documentado la participación de las aferencias vagales tanto mecanorreceptoras como quimiorreceptoras situadas en los distintos segmentos del tracto gastrointestinal (González y Deutsch, 1981; Ritter *et al.*, 1994) y cuyos primeros relevos se sitúan en la zona intermedio-caudal del NTS, quienes proyectan a continuación hacia la parte interna del PBle (Herbert *et al.*, 1990; Jia *et al.*, 1994). También el subnúcleo dorsomedial del NTS inerva la parte externa del PBle (Fulwiler y Saper, 1986; Herbert *et al.*, 1990; Jia *et al.*, 1994; Karimnamazi *et al.*, 2002).

La relevancia del PBle en el procesamiento de señales viscerales a Corto Plazo se pone de manifiesto también a través de una serie de estudios en los que lesiones del PBle interrumpen el aprendizaje discriminativo gustativo, en los que se utiliza como estímulo visceral tanto la administración intragástrica de productos reforzantes (alimentos predigeridos) (Zafra *et al.*, 2002) como de sustancias tóxicas (Mediavilla *et al.*, 2000). Esta participación del PBle parece ser relevante, conviene insistir, sólo cuando las demandas temporales de la tarea son muy estrictas (Mediavilla *et al.*, 2000;

Zafra *et al.*, 2002). Así, lesiones electrolíticas bilaterales del PBle impedirían la adquisición del Aprendizaje Gustativo Concurrente (a Corto Plazo) al interrumpir presumiblemente la transmisión de la información viscerosensorial ascendente procedente del Nervio Vago (Sakai y Yamamoto, 1999; Mediavilla *et al.*, 2000; Reilly y Trifunovic, 2000a, b, 2001; Zafra *et al.*, 2002).

Ahora, en el presente estudio podría ocurrir que las lesiones parabraquiales interrumpieran también las señales digestivas rápidas necesarias para desencadenar las conductas compensatorias requeridas tras la extracción parcial de contenidos nutritivos gástricos. En cualquier caso, esta participación parabraquial podría implicar información tanto gátrica como post-gátrica, una cuestión que está por determinar. Sean las señales gástricas, las postgástricas o ambas las responsables de producir estos procesos nutritivos a Corto Plazo, esta información (generalmente de distensión gátrica) será transmitida al encéfalo a través de la vía neuroanatómica Vagal-PBle.



## **EXPERIMENTO 7: Relevancia del Eje Parabraquial (PBI y PBle)-Amigdalino (CeL) en la Ingesta de Sacarosa: Efecto de la administración de Naloxona.**

El Complejo Parabraquial, y específicamente el PBle, mantiene importantes conexiones viscero-sensoriales con centros rostrales, como el CeA, y particularmente con el CeL (Bernard *et al.*, 1993) (ver Figura 0.3). Así, por ejemplo, se ha observado activación, entre otros núcleos cerebrales, del CeA (incluido el CeL) tras la administración de productos aversivos (por ejemplo, HCl) que inducen AAvG (Ervin *et al.*, 1990) y que puede ser bloqueada mediante Vagotomías (Michl *et al.*, 2001).

Sin embargo, y en general, las lesiones efectuadas en la Amígdala ofrecen resultados contradictorios. Concretamente, hiperfagia y/o ganancia de peso (Bucy y Klüver, 1955; Box y Mogenson, 1975; Leonard *et al.*, 1982; Bovetto y Richard, 1995), afagia y/o pérdida de peso (Cole, 1974; Box y Mogenson, 1975; Ganaraj y Jeganathan, 1998), o total ausencia de efecto sobre la ingesta de comida y peso corporal (Dacey y Grossman, 1977; Kemble *et al.*, 1979; Schoenfeld y Hamilton, 1981; Ritter y Hutton, 1995). En este sentido, se ha sugerido que la localización de las lesiones que producen afagia podrían implicar daño incidental de estructuras adyacentes, no amigdalinas (Rollins y King, 2000) como, por ejemplo, el Globus Palidus (Morgane, 1961; Leonard *et al.*, 1975; Dacey y Grossman, 1977; Palfai *et al.*, 1984; Schoenfeld y Hamilton, 1981). De hecho, lesiones limitadas del CeA, sin daño en el Globus Palidus, no producen hipofagia, pérdida de peso o déficit sensorio-motor (Dacey y Grossman, 1977; Kemble *et al.*, 1979; Schoenfeld y Hamilton, 1981; Leonard y Hahn, 1982; Bovetto y Richard, 1995; Ritter y Hutton, 1995).

Sin embargo, algunos estudios (King *et al.*, 1993a, b; King *et al.*, 1997; King *et al.*, 1998) han observado hiperfagia y obesidad moderada en animales con lesiones en la región posterodorsal de la Amígdala (APD) aunque, a menudo, estas lesiones invaden la porción caudal del CeA (Rollins y King, 2000), una región en la cual se produce hiperfagia y ganancia de peso cuando las lesiones incluyen daño en su mitad ventral (Box y Mogenson, 1975).

Por otra parte, y desde una perspectiva neuroquímica, diversos autores han implicado al sistema Opiáceo en la modulación de la nutrición (Stapleton *et al.*, 1979; Kirkham y Blundell, 1986; Carr *et al.*, 1991; Higgs y Cooper, 1997; Glass *et al.*, 1999b; Zhang y Kelley, 2000; Richardson *et al.*, 2005). Estos estudios han observado que el

consumo de comida y agua aumenta con la administración de agonistas y disminuye con el uso de fármacos antagonistas (Kirkham y Blundell, 1986; Carr *et al.*, 1991; Parker *et al.*, 1992; Giraudo *et al.*, 1998; Ferraro *et al.*, 2002; Frisina y Sclafani, 2002; Zhang y Kelley, 2002), bien sea por su carácter aversivo (en el segundo caso) (Stein y Belluzzi, 1978; Schaefer y Michael, 1981, 1985, 1988; Kelsey *et al.*, 1984; Stolerman, 1985; Rudski *et al.*, 1997; Bielajew *et al.*, 2003; Shoblock y Maidment, 2006), bien por su influencia sobre los procesos post-ingestivos implicados en la Saciación (Kirkham y Blundell, 1984, 1986; Glass *et al.*, 1999, 2000) o, en fin, por su antagonismo sobre las propiedades oro-sensoriales hedónicas (Cooper, 1980, 1983; Kirkham y Cooper, 1988a, b; Parker *et al.*, 1992; Kanarek *et al.*, 1997; Yeomans y Gray, 1997; Yu *et al.*, 1999; Kelley *et al.*, 2002; Richardson *et al.*, 2005).

El Pble, por su parte, ha sido relacionado con el procesamiento reforzante, de índole opiácea, inducido mediante Estimulación Eléctrica Intracerebral (Simón *et al.*, 2007) o también por la administración intragástrica de nutrientes (por ejemplo, lactosa, sacarosa, glucosa, maltosa o policosa) (Wang *et al.*, 1999; Yamamoto y Sawa, 2000a) o inducido por el consumo de sustancias apetitivas, como la Sacarina (Yamamoto y Sawa, 1994, 2000b). De hecho, tanto las lesiones generales del Área Parabraquial lateral (que suele incluir al Pble) (Edwards y Ritter, 1989) como las lesiones específicas del Pble (Zafra *et al.*, 2002) eliminan, respectivamente, la preferencia por las comidas apetitivas o hacia estímulos gustativos asociados con la administración intragástrica de alimentos reforzantes.

En este último contexto, el CeA ha sido implicado concretamente en la integración de las señales gustativas, hedónicas y autonómicas propias de la ingesta de comida (Pomonis *et al.*, 2000), las cuales también suelen incluir mecanismos opiáceos (Li y Rowland, 1993; Giraudo *et al.*, 1998; Swanson y Petrovich, 1998; Glass *et al.*, 2000), activándose, por ejemplo, tras la administración periférica de antagonistas (Pomonis *et al.*, 1997, 2000; Carr *et al.*, 1998; Gestreau *et al.*, 2000; Georges *et al.*, 2000; Hamlin *et al.*, 2001, 2004; Le Guen *et al.*, 2001; Veinante *et al.*, 2003). Más aún y en esta línea, el CeA parece estar relacionado con la liberación de opiáceos endógenos que son generados por el consumo de Sacarosa (Pomonis *et al.*, 2000).

Sin embargo, la baja densidad de receptores opiáceos en el CeA y la significativa expresión *c-fos* inducida por la administración de Naloxona sugiere un efecto bloqueador del control tónico inhibitorio opiáceo ejercido sobre el CeA de alguna

otra estructura que sí posea dichos receptores (Le Guen *et al.*, 2001, 2003).

De acuerdo con este planteamiento, el presente experimento pretende examinar, en primer lugar, si las lesiones del PBL, y en particular del PBLe, o del CeL influyen sobre la ingesta de Sacarosa en animales privados de agua pero no de comida. Más aún, se examinará la influencia del Sistema Opiáceo sobre los probables efectos de las lesiones sobre la nutrición.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

### **SUJETOS**

Se utilizaron 31 ratas de la raza Wistar procedentes del animalario de la Universidad de Granada y cuyos pesos, al comenzar el procedimiento quirúrgico, se encontraban entre 270 y 320 g. Estos animales fueron asignados aleatoriamente a 5 grupos: 1) grupo lesionado en el Núcleo Parabraquial Lateral (PBL, n= 6), 2) grupo lesionado en el Núcleo Parabraquial Lateral Externo (PBLe, n= 6), 3) grupo lesionado en el Núcleo Central Lateral de la Amígdala (CeL, n= 7), 4) grupo control no lesionado al que se le aplicó el mismo procedimiento experimental que a los demás grupos [Nx, n= 6 (2 con paso de electrodo de PBL; 2 con paso de CeL; 2 sin paso)] y 5) grupo control sin lesión al que se les administró Agua Destilada en todas las fases experimentales [Veh, n=6 (2 con paso de electrodo de PBL; 2 con paso de CeL; 2 sin paso)].

Todos los animales fueron alojados en jaulas metacrilato de 30x30x30 cm. (de características similares a las descritas en el Capítulo I y II de la presente Tesis Doctoral) y con comida y agua *ad libitum* durante la semana de habituación previa a la cirugía. Las condiciones ambientales de luz y temperatura fueron similares a las descritas anteriormente y fueron mantenidas constantes, dentro del rango descrito en los experimentos previos.

### **PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO**

El procedimiento seguido para la realización de las distintas lesiones electrolíticas fue similar al descrito en los experimentos anteriores, adaptándolo a las particularidades de cada núcleo cerebral. Las coordenadas estereotáxicas utilizadas fueron obtenidas a partir del atlas de Paxinos y Watson (1986): 1) en el caso del PBL (AP: -0.16. mm.; L: +2.4 mm.; V: +3.4 mm.) se utilizó una corriente eléctrica de 2 mA. durante 20 seg. a través de un electrodo aislado excepto en sus 0.5 mm. distales,



2) para el PBle (AP: -0.16 mm.; L: +-2.4 mm.; V: +3.0 mm.) se empleó una corriente de 0.3 mA. durante 10 seg., y finalmente 3) para el CeL (AP: +6.42 mm.; L: +-4.3 mm.; V: +2.05 mm.) se usó una corriente de 1.2 mA. durante 20 seg. a través de un electrodo sin aislar en sus 0.5 mm. distales.

La lesión ficticia de los animales controles reproduce todos los pasos anteriores, si bien la coordenada vertical que se usó fue situada 1 mm. por encima del objetivo vertical (para no afectar al núcleo) y sin que se produjera el paso de corriente eléctrica en ninguno de los casos.

## **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

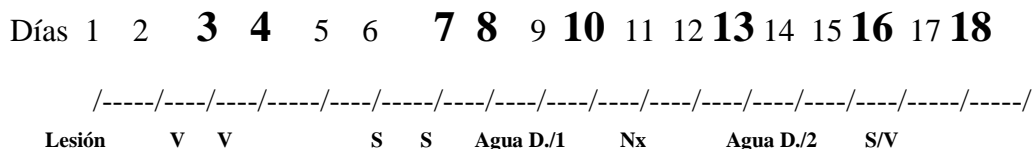
a) Fase Experimental I (Figura 3.2): 2 días después de finalizar las intervenciones quirúrgicas intracerebrales (día 1º) los animales son privados de agua, aunque con acceso libre a la comida, que sólo sería retirada al comenzar las sesiones de ingesta. Así, en el 3º y 4º día se les ofrece una solución de Vainilla a través de una bureta situada a la derecha del animal, contabilizándose el consumo realizado durante 10 minutos (este procedimiento pretende que, en su caso, los animales asocien a la Vainilla la potencial aversión generada por la intervención quirúrgica). Durante los 2 días siguientes los animales dispusieron de libre acceso al agua. El 6º día es utilizado como periodo de privación de agua. Durante los dos días posteriores (7º y 8º día) se les ofrece a los animales una solución de Sacarosa (10%) a través de una bureta situada ahora a la izquierda del animal, cuantificándose a continuación la ingesta efectuada durante 10 minutos (esta manipulación tiene como objetivo evitar posible neofobia a la Sacarosa en las siguientes fases experimentales).

Al finalizar la ingesta del 8º día, a los animales se les ofrece durante 24 h. una bureta de agua *ad libitum*, para volver a ser privados al día siguiente (9º día).

b) Fase Experimental II (Figura 3.2): Entre los días 10º y 16º se utilizó un diseño experimental intrasujeto ABA, aunque sólo en los días 10º, 13º y 16º se llevaron a cabo las pruebas experimentales propiamente dichas. Así, tras un periodo de privación de agua de 24 h., pero con acceso a comida, los animales reciben sucesivamente la administración subcutánea de Agua Destilada (Agua D./1), Nx, y de nuevo, Agua Destilada (Agua D./2) respectivamente, excepto para el caso del grupo Vehículo que en las 3 sesiones experimentales recibieron Agua Destilada. Veinte minutos después de la administración subcutánea del tratamiento correspondiente a los animales se les ofrece 2 buretas [Sacarosa (Izquierda)/Vainilla

(Derecha)] durante 30 minutos, contabilizándose la ingesta de cada una de ellas. Durante las 48h. comprendidas entre cada tratamiento los animales disponen de buretas con agua y comida *ad libitum*.

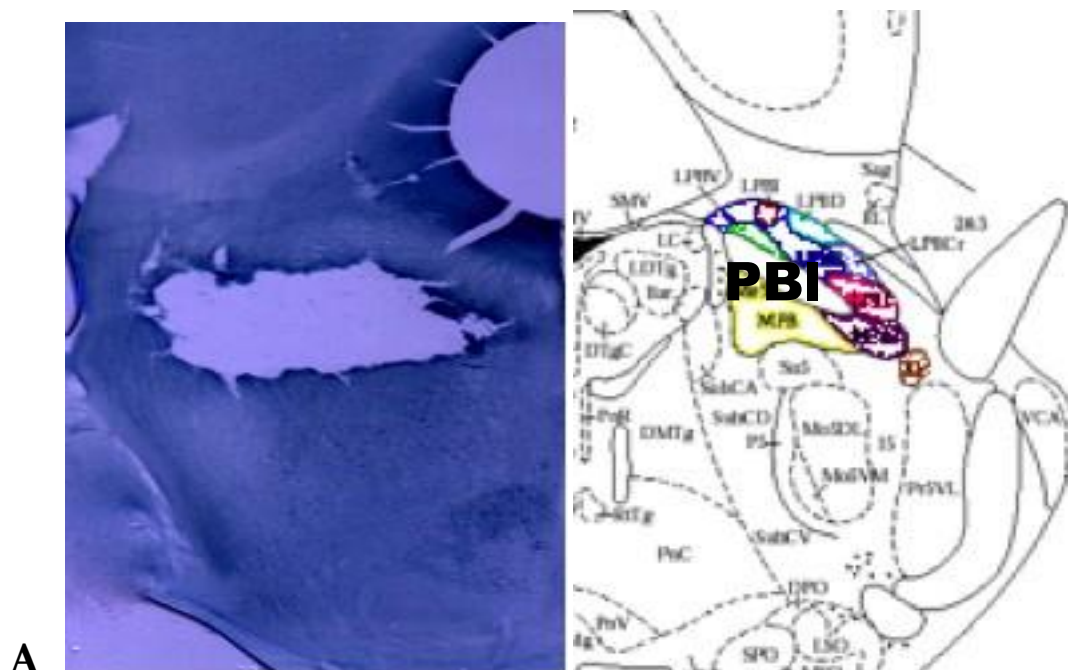
c) Fase Post-Experimental (Figura 3.2): En el día 18º los animales disponen de las dos buretas (Sacarosa/Vainilla), aunque en esta ocasión no reciben la administración de producto alguno (se pretende comprobar si los animales habían desarrollado aversiones gusto-olfatorias de algún tipo).



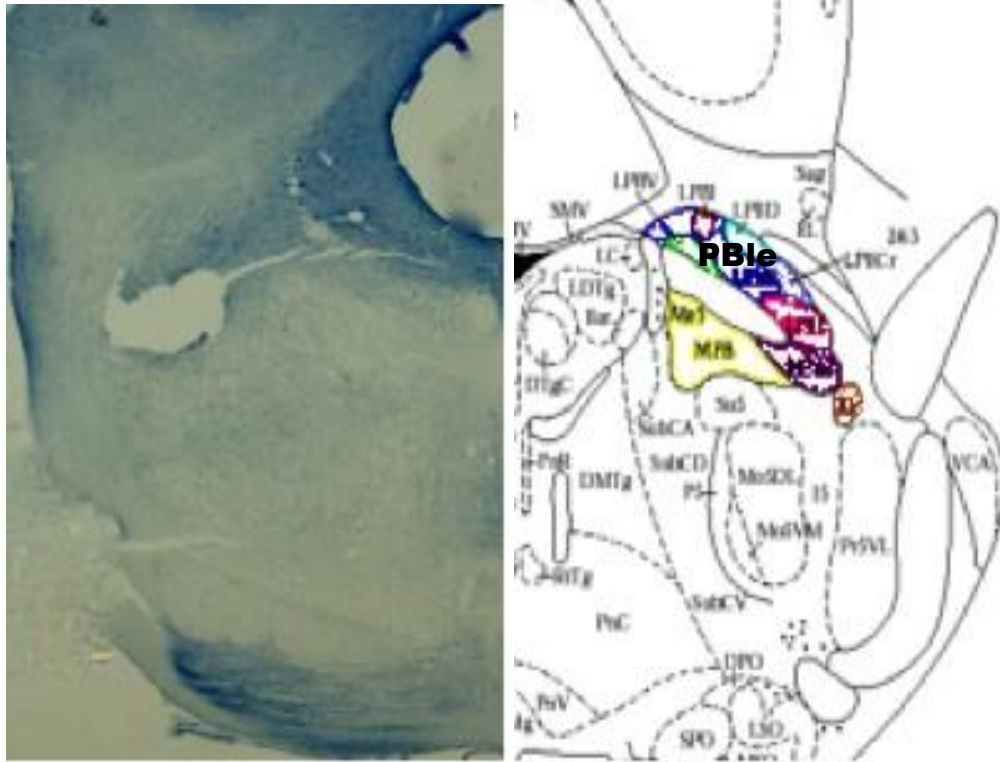
**Figura 3.2:** Secuencia temporal del experimento. V: Vainilla; S: Sacarosa; Agua D.: Agua destilada; Nx: Naloxona.

## HISTOLOGÍA

Una vez finalizado el experimento, todos los animales lesionados fueron perfundidos transcárdialmente con 40 ml. de suero fisiológico y otros 40 ml. de formaldehído al 4%. Sus cerebros fueron laminados en secciones coronales de 50 micras, montadas y teñidas siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo I de la presente Tesis Doctoral (Fotografía 3.3).



**B**



**C**



**Fotografía 3.3:** Localización de las distintas lesiones electrolíticas realizadas en PBI (A), PBle (B) y CeL (C), tomando como referencia el atlas neuroanatómico de Paxinos y Watson (1986).

## RESULTADOS

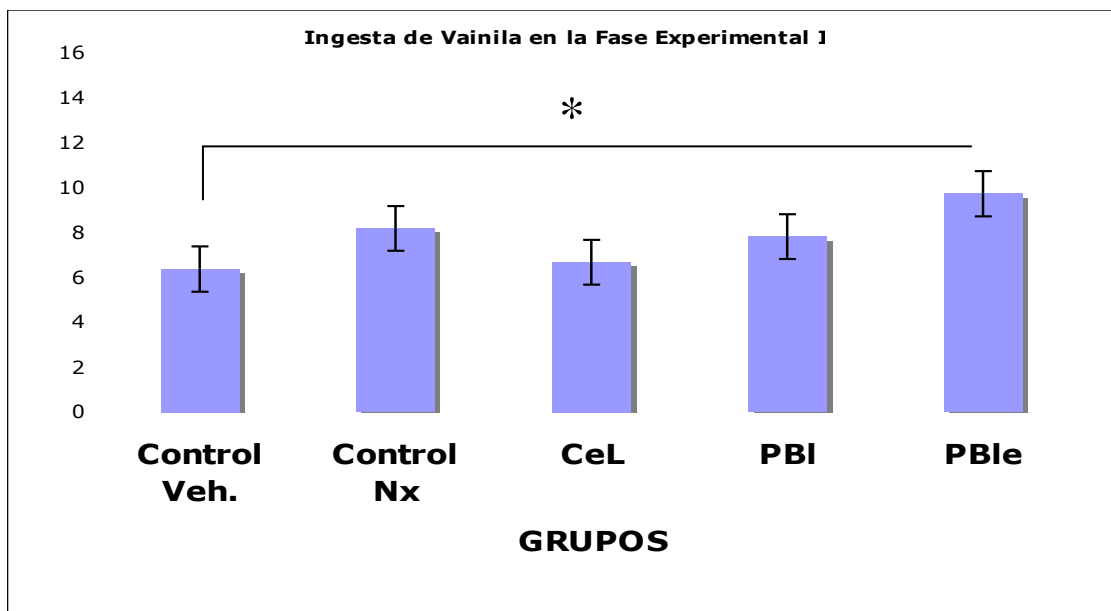
### PESOS CORPORALES

Los datos fueron analizados usando un ANOVA entregupo y no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los pesos de los animales de los distintos grupos (Media del peso de: PBl= 298.63g.; PBle: 289.15g.; CeL: 289.28g.; Control Nx: 312.0g.; y Control Veh.: 288.35g.) al inicio del experimento [ $F(4,26)= 2.33$ ,  $p= 0.08$ ].

### INGESTA DE VAINILLA Y SACAROSA (FASE EXPERIMENTAL

#### I)

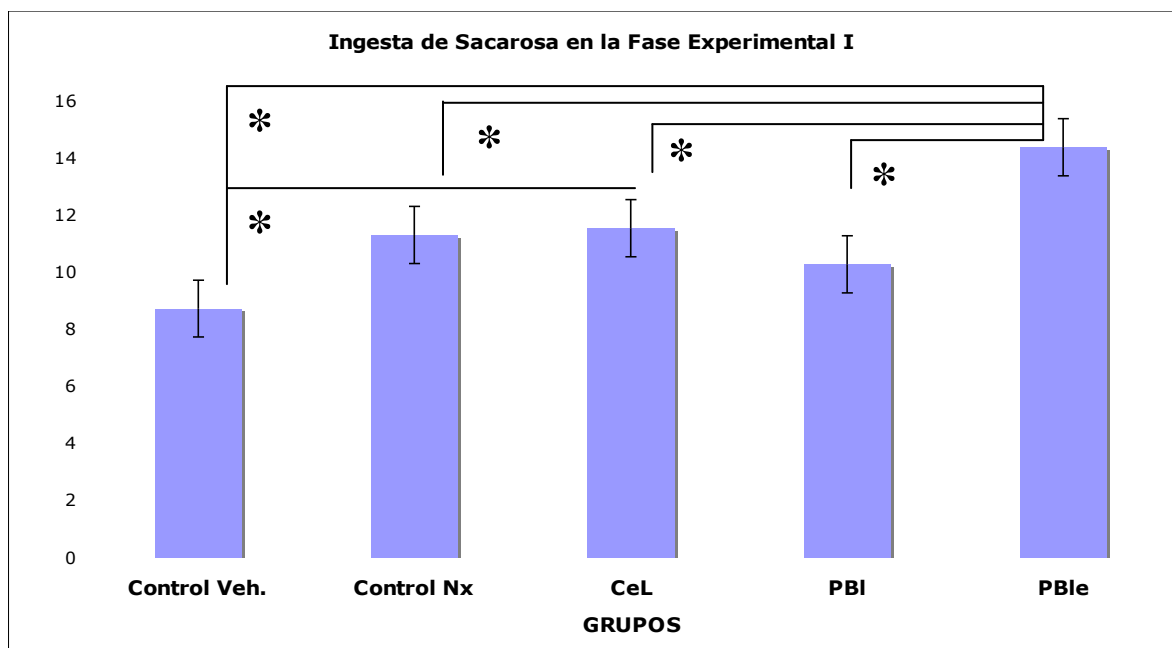
Los datos analizados, usando un ANOVA, correspondiente al día 3° y 4° día muestran que el grupo lesionado en el PBle presenta diferencias estadísticamente significativas en la cantidad ingerida de Vainilla en comparación con el grupo Control Veh. en la prueba de 10 min. [ $F(1,26)= 8.17$ ,  $p= 0.008$ ], sin que aparezcan diferencias significativas en la ingesta de Vainilla entre el grupo PBle y el PBl [ $F(1,27)= 2.52$ ,  $p= 0.12$ ] (Gráfica 3.9).



**Gráfica 3.9:** Media de las cantidades ingeridas de Vainilla de los dos días de la Fase Experimental I del grupo Control Veh., Control Nx, CeL, PBl y PBle durante 10 min.

Por otra parte y con respecto a la ingesta de Sacarosa, el grupo PBle muestra diferencias significativas en la cantidad ingerida (día 7° y 8°) en comparación con los

dos grupos Controles [Control Veh.:  $F(1,26)= 19.40$ ,  $p= 0.001$ ; Control Nx:  $F(1,26)= 5.76$ ,  $p= 0.02$ ] y con el grupo CeL [ $F(1,26)= 4.73$ ,  $p= 0.03$ ] (Gráfica 3.10). Más aún, se producen diferencias significativas en las cantidades ingeridas de Sacarosa entre el grupo PBle y PBI [ $F(1,27)= 19.16$ ,  $p= 0.005$ ] (Gráfica 3.10).



**Gráfica 3.10:** Media de las cantidades ingeridas de Sacarosa (10%) de los dos días de la Fase Experimental I del Grupo Control Veh., Control Nx, CeL, PBI y PBle durante 10 min.

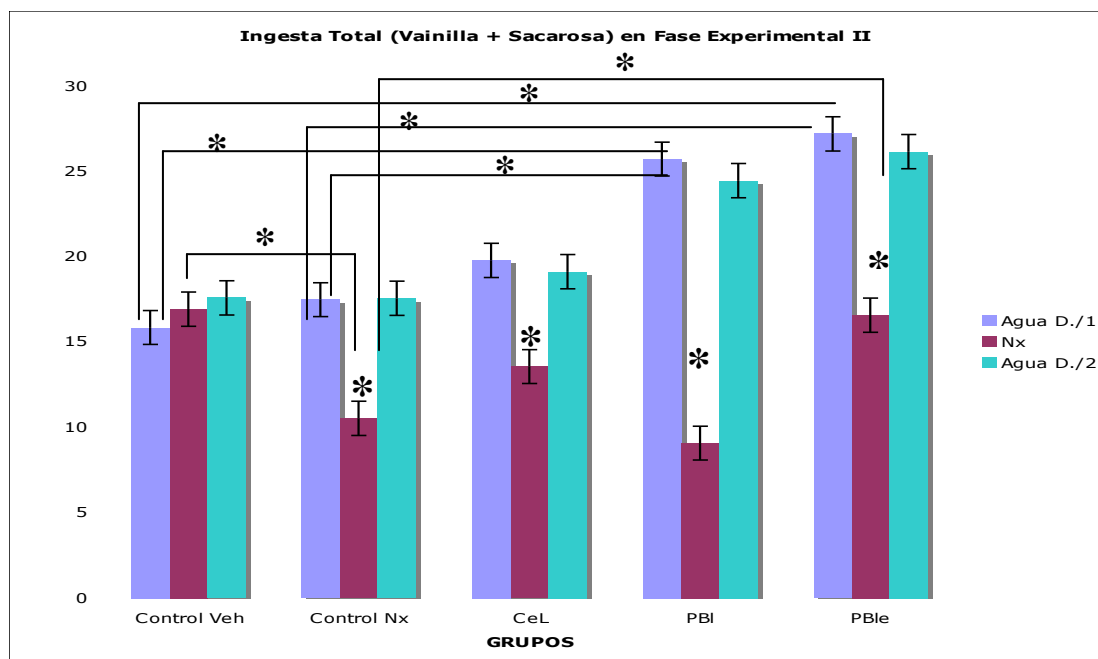
Por el contrario, el grupo lesionado en el PBI no muestra diferencias con respecto a los dos grupos Controles en las cantidades ingeridas de Sacarosa [Control Veh.:  $F(1,26)= 1.47$ ,  $p= 0.23$ ; Control Nx:  $F(1,26)= 0.62$ ,  $p= 0.43$ ] (Gráfica 3.10).

Finalmente, los animales lesionados en el CeL muestran diferencias significativas en las cantidades ingeridas de Sacarosa con respecto al grupo Control Veh. [ $F(1,26)= 5.18$ ,  $p= 0.03$ ] (Gráfica 3.10).

## **INGESTA DE SACAROSA TRAS LA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE NALOXONA (FASE EXPERIMENTAL II)**

Los datos de esta fase experimental (día 10°, 13° y 16°) fueron analizados utilizando un ANOVA con medidas repetidas. Este análisis revela que todos los grupos, excepto el grupo Control Vehículo [ $F(1,26)= 0.01$ ;  $p= 0.91$ ], muestran diferencias significativas intragrupo ( $p= 0.001$ ) en la ingesta total (Vainilla y Sacarosa) cuando se compara la Fase 1 (Agua D./1) y la Fase 3 (Agua D./2) con la Fase 2 (Nx), en la que se produce una reducción en la ingesta total (tras la administración

subcutánea de Naloxona) sin que se produzcan diferencias significativas intragrupo en la ingesta total entre la Fase 1 (Agua D./1) y la Fase 3 (Agua D./2) (Gráfica 3.11). Esto último sugiere que se ha producido una recuperación total de la ingesta dos días después de la administración subcutánea de Nx.



**Gráfica 3.11:** Ingesta Total (Vainilla + Sacarosa) del grupo Control Veh., Control Nx, CeL, PBI, y PBle tras un periodo de privación de agua de 24 h., en la Fase Experimental II, es decir, en el diseño experimental intrasujeto A (administración subcutánea de agua destilada) B (administración subcutánea de Naloxona) A (administración subcutánea de agua destilada) durante 30 minutos.

Por otra parte, los grupos con lesión Parabraquial (PBI y PBle) muestran diferencias significativas en la ingesta total (Vainilla + Sacarosa) consumida en la Fase 1 (Agua D./1) con respecto al grupo Control Nx [PBI:  $F(1,26)= 6.21$ ,  $p= 0.01$ ; PBle:  $F(1,26)= 8.65$ ,  $p= 0.006$ ; CeL:  $F(1,26)= 0.52$ ,  $p= 0.47$ ; Control Veh:  $F(1,26)= 0.24$ ,  $p= 0.62$ ] y al grupo Control Vehículo [PBI:  $F(1,26)= 8.92$ ,  $p= 0.006$ ; PBle:  $F(1,26)= 11.80$ ,  $p= 0.001$ ; CeL:  $F(1,26)= 1.52$ ,  $p= 0.22$ ; Control Nx:  $F(1,26)= 0.24$ ,  $p= 0.62$ ], desarrollándose así un posible efecto de hiper-ingesta en ambos grupos (Gráfica 3.11).

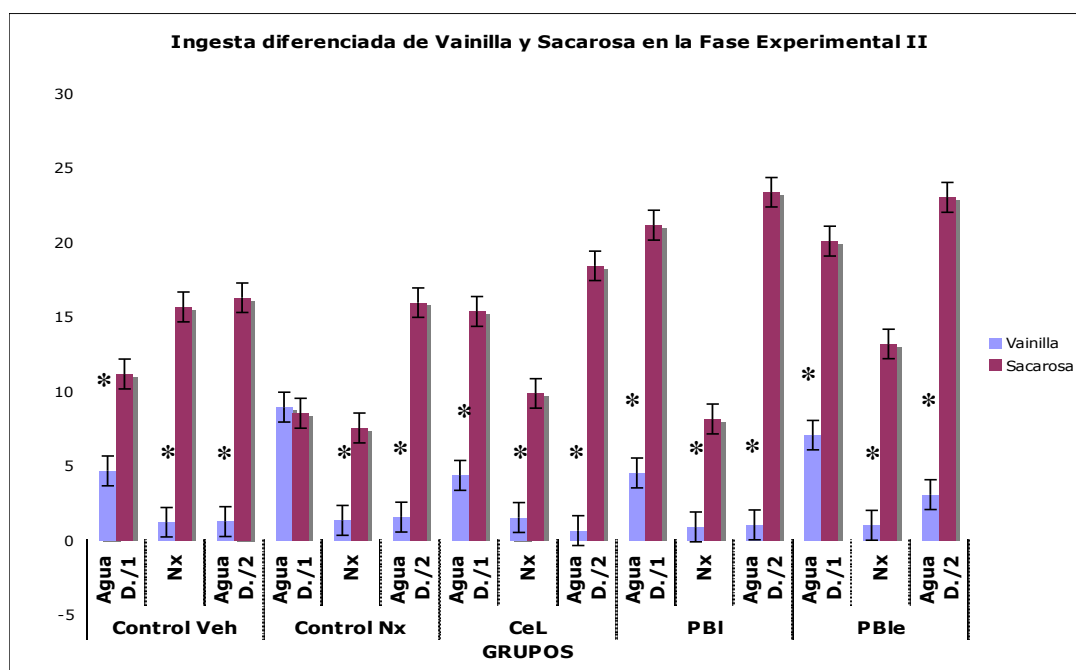
Por su parte, el análisis de los resultados entregrupos sobre la Ingesta Total (Vainilla + Sacarosa) permite comprobar que el grupo con lesión del PBle y el grupo Control Vehículo muestran diferencias significativas en la ingesta total producida en la Fase Nx con respecto al grupo Control Nx [PBI:  $F(1,26)= 0.07$ ,  $p= 0.78$ ; PBle:  $F(1,26)= 10.56$ ,  $p= 0.003$ ; CeL:  $F(1,26)= 1.55$ ,  $p= 0.22$ ; Control Veh:  $F(1,26)= 11.48$ ,  $p= 0.002$ ] (Gráfica 3.11). Esto es, la lesión del PBle disminuye la reducción de la

ingesta total inducida tras la administración subcutánea de Nx.

Finalmente, no existen diferencias significativas en la ingesta total (Vainilla + Sacarosa) en la Fase Nx entre el grupo PBl y el grupo Control Nx [ $F(1,26) = 0.07$ ,  $p = 0.78$ ] (Gráfica 3.11). Esto último sugiere que el incremento en la ingesta total observado en el grupo PBl en la Fase Nx no se debería tanto a una lesión general del Complejo Parabraquial, ya que, si así fuese, el grupo PBl debería haber mostrado también dichas diferencias. La diferencia en la ingesta total entre el grupo PBl y el PBl en la Fase Nx [ $F(1,26) = 8.87$ ,  $p = 0.006$ ] sugiere una mayor relevancia para el segundo de estos grupos.

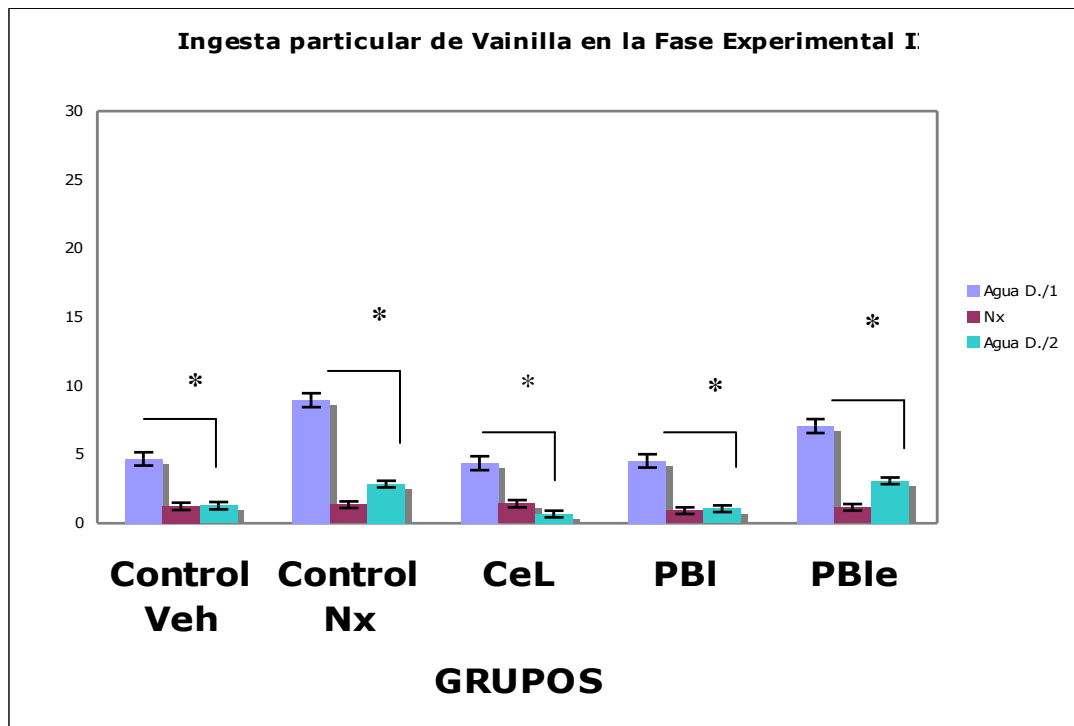
## INGESTA DIFERENCIADA DE Vainilla O Sacarosa TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE NALOXONA

Todos los grupos, excepto el Control Nx, muestran diferencias significativas entre la cantidad ingerida de Sacarosa y de Vainilla en la Fase 1 (Agua D./1) [PBl:  $F(1,26) = 35.91$ ,  $p = 0.001$ ; PBl:  $F(1,26) = 22.02$ ,  $p = 0.001$ ; CeL:  $F(1,26) = 18.34$ ,  $p = 0.001$ ; Control Nx:  $F(1,26) = 0.02$ ,  $p = 0.88$ ; Control Veh.:  $F(1,26) = 5.46$ ,  $p = 0.02$ ], mientras que todos los grupos, sin excepción, muestran dicha diferencia ( $p = 0.01$ ) en las dos siguientes fases (Gráfica 3.13).



**Gráfica 3.13:** Ingesta diferenciada de Vainilla y Sacarosa (10%) de los Grupos Control Veh., Control Nx, CeL, PBl y PBl, tras un periodo de privación de agua de 24 h., en la Fase Experimental II, es decir, en el diseño experimental intrasujeto A (administración subcutánea de agua destilada) B (administración subcutánea de Naloxona) A (administración subcutánea de agua destilada) durante 30 minutos.

Con respecto a la ingesta particular de Vainilla, ninguno de los grupos lesionados (PBI, PBle y CeL) muestran diferencias estadísticamente significativas en el consumo producido en la Fase 1 (Agua D./1) con respecto al grupo Control Veh. [PBI:  $F(1,26)= 0.008$ ,  $p= 0.92$ ; PBle:  $F(1,26)= 2.22$ ,  $p= 0.14$ ; CeL:  $F(1,26)= 0.036$ ,  $p= 0.84$ ]. Por otro lado, en todos los grupos existen diferencias intragrupos significativas en la ingesta parcial de Vainilla entre la Fase 1 (Agua D./1) y Fase 3 (Agua D./2) [PBI:  $F(1,26)= 7.22$ ,  $p= 0.01$ ; PBle:  $F(1,26)= 9.52$ ,  $p= 0.004$ ; CeL:  $F(1,26)= 9.65$ ,  $p= 0.004$ ; Control Nx:  $F(1,26)= 32.30$ ,  $p= 0.001$ ; Control Vehículo:  $F(1,26)= 6.88$ ,  $p= 0.01$ ], con una disminución en las cantidades consumidas (Gráfica 3.14) que no parece deberse a un efecto aversivo de la Nx, ya que el grupo Control Vehículo también muestra dicha disminución y no recibe Nx.

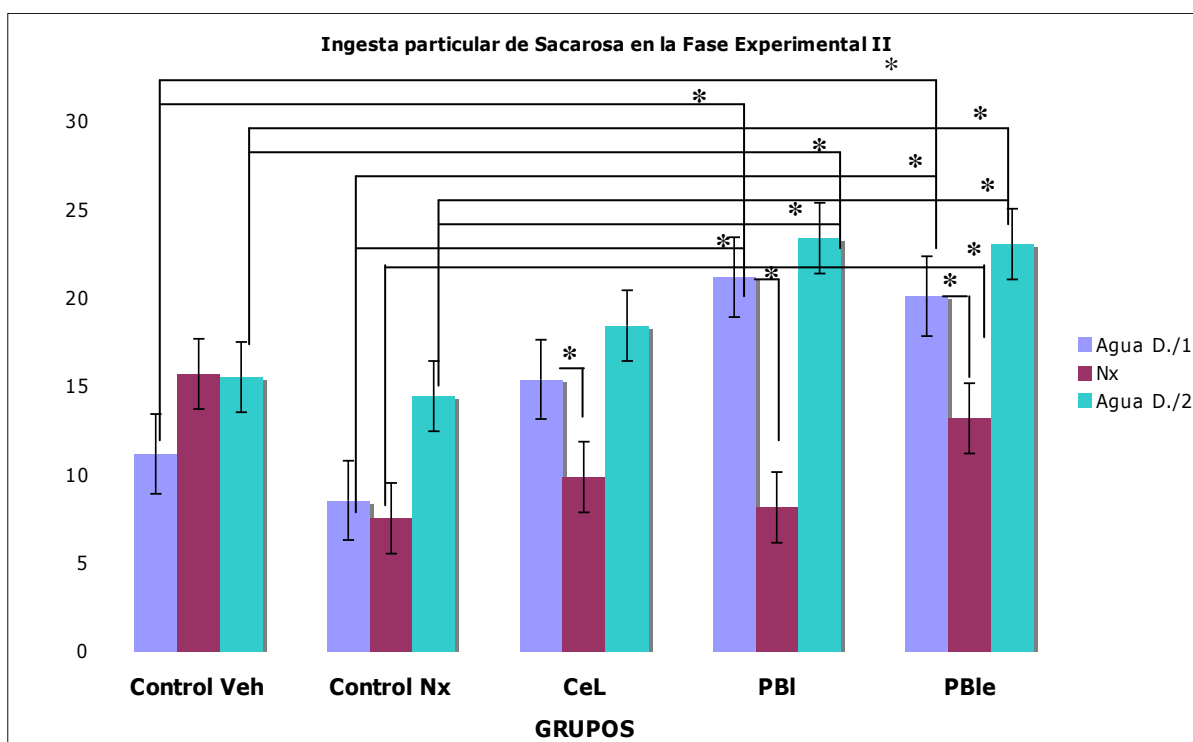


**Gráfica 3.14:** Ingesta particular de Vainilla del grupo Control Veh., Control Nx, CeL, PBI y PBle, tras un periodo de privación de agua de 24 h., en la Fase Experimental II, es decir, en el diseño experimental intrasujeto A (administración subcutánea de agua destilada) B (administración subcutánea de Naloxona) A (administración subcutánea de agua destilada) durante 30 minutos.

Con respecto a la ingesta de Sacarosa, los dos grupos parabraquiales (PBI y PBle) muestran diferencias significativas, durante la Fase 1 (Agua D./1), con respecto a los dos grupos Controles [PBI vs. Control Veh.:  $F(1,26)= 9.46$ ,  $p= 0.004$ ; PBI vs. Control Nx:  $F(1,26)= 15.09$ ,  $p= 0.001$ ; PBle vs. Control Veh.:  $F(1,26)= 7.55$ ,  $p= 0.01$ ; PBle vs. Control Nx:  $F(1,26)= 12.65$ ,  $p= 0.001$ ], lo cual sugiere un efecto hiperfágico tras las lesiones parabraquiales (Gráfica 3.15). Más aún, sólo los dos



grupos con lesiones parabraquiales (PBI y PBl) muestran diferencias significativas en la ingesta de Sacarosa en la Fase 3 (Agua D./2) con respecto a los dos grupos Controles [PBI vs. Control Veh.:  $F(1,26)= 4.99$ ,  $p= 0.03$ ; PBI vs. Control Nx:  $F(1,26)= 5.08$ ,  $p= 0.03$ ; PBl vs. Control Veh.:  $F(1,26)= 4.58$ ,  $p= 0.04$ ; PBl vs. Control Nx:  $F(1,26)= 4.66$ ,  $p= 0.04$ ]. No existen diferencias en la ingesta entre el grupo PBI y el PBl [Fase Agua D./1:  $F(1,27)= 0.10$ ,  $p= 0.74$ ; Fase Agua D./2:  $F(1,27)= 0.008$ ,  $p= 0.92$ ], lo cual viene a destacar la mayor importancia relativa del PBl. No se producen diferencias significativas en la ingesta de Sacarosa entre la Fase 1 (Agua D./1) y la Fase 2 (Nx) en los dos grupos Controles [Control Nx:  $F(1,26)= 0.15$ ,  $p= 0.69$ ; Control Veh.:  $F(1,26)= 3.22$ ,  $p=0.08$ ]. Por el contrario, sí se produce una disminución significativa entre ambas fases en los tres grupos lesionados (PBI, PBl y CeL) [PBI:  $F(1,26)= 26.67$ ,  $p= 0.001$ ; PBl:  $F(1,26)= 7.51$ ,  $p= 0.01$ ; CeL:  $F(1,26)= 5.59$ ,  $p= 0.02$ ]. Sin embargo, en la Fase 2 (Nx), la ingesta de Sacarosa de los tres grupos lesionados no muestra diferencias significativas con respecto a la ingesta de Sacarosa en la Fase 1 (Agua D./1) del grupo Control Nx [PBI:  $F(1,5)= 0.009$ ,  $p= 0.92$ ; PBl:  $F(1,5)= 4.54$ ,  $p= 0.08$ ; CeL:  $F(1,5)= 3.26$ ,  $p= 0.13$ ] (Gráfica 3.15), por lo que la Nx parece eliminar el posible efecto de hiperfagia inducido tras las tres lesiones cerebrales.



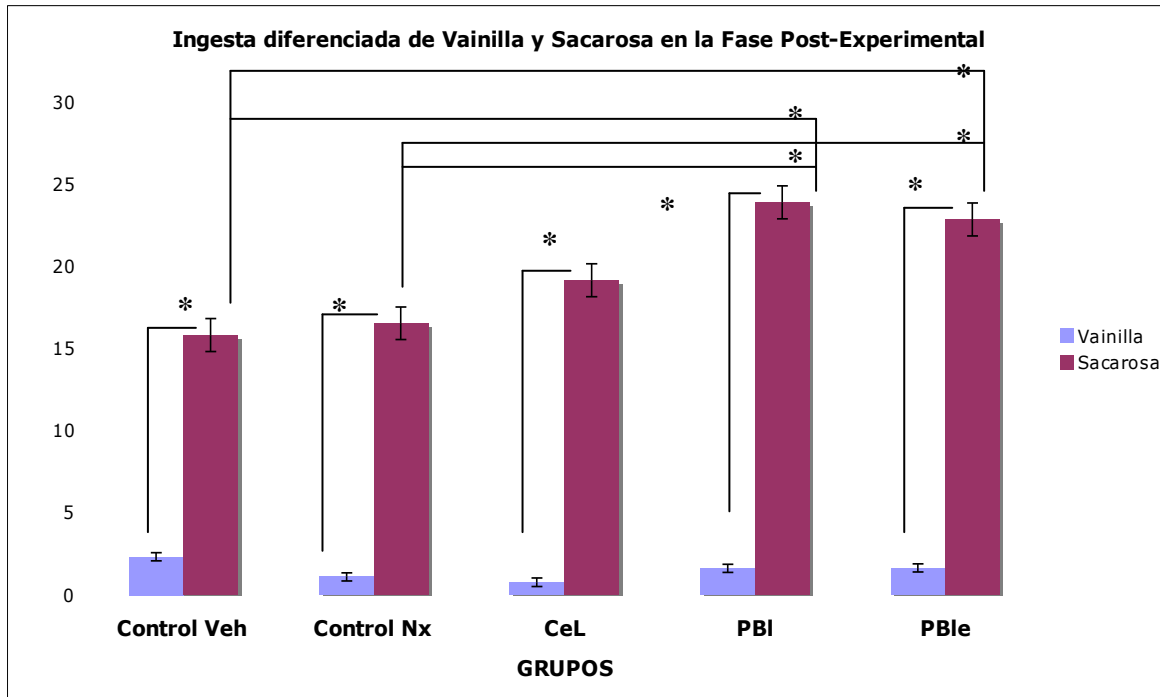
**Gráfica 3.15:** Ingesta particular de Sacarosa del grupo Control Veh., Control Nx, CeL, PBI y PBl, tras un periodo de privación de agua de 24 h., en la Fase Experimental II, es decir, en el diseño experimental intrasujeto A (administración subcutánea de agua destilada) B (administración subcutánea de Naloxona) A (administración subcutánea de agua destilada) durante 30 minutos.

Sin embargo, de los grupos lesionados sólo el grupo PBle muestra diferencias significativas en la ingesta de Sacarosa en la Fase Nx con respecto al grupo Control Nx [PBl:  $F(1,26)= 0.05$ ,  $p= 0.81$ ; PBle:  $F(1,26)= 4.53$ ,  $p= 0.04$ ; CeL:  $F(1,26)= 0.82$ ,  $p= 0.37$ ], a diferencia de lo que sucede con el grupo PBl [ $F(1,26)= 0.05$ ,  $p= 0.81$ ] y el grupo CeL [ $F(1,26)= 0.82$ ,  $p= 0.37$ ] (Gráfica 3.15), lo cual sugiere que el PBle podría procesar en mayor medida algunas de las propiedades anoréxicas de la Naloxona.

Finalmente, sólo el grupo Control Nx muestra diferencias intragrupo en la ingesta de Sacarosa entre la Fase 1 (Agua D./1) y la Fase 3 (Agua D./2) [PBl:  $F(1,26)= 0.55$ ,  $p= 0.46$ ; PBle:  $F(1,26)= 0.98$ ,  $p= 0.32$ ; CeL:  $F(1,26)= 1.24$ ,  $p= 0.27$ ; Control Nx:  $F(1,26)= 5.44$ ,  $p= 0.02$ ; Control Veh:  $F(1,26)= 2.15$ ,  $p= 0.15$ ], mostrando un aumento en la ingesta tras la Fase Nx (Gráfica 3.15). Estos datos reflejarían, en cierto modo, que los tres núcleos lesionados (PBl, PBle y CeL) incrementan la preferencia por la Sacarosa tras la Fase Nx, o que, teniendo en cuenta que el Grupo Control Nx es el que ingiere menos cantidad de Sacarosa en la Fase 2 (Nx), estos animales compensarían el déficit energético al día siguiente en la Fase 3 (Agua D./2).

## **INGESTA DIFERENCIAL EN AUSENCIA DE ADMINISTRACIONES subcutáneas (Fase post-EXPERIMENTAL)**

Finalmente, en la última sesión experimental (día 18) todos los grupos muestran diferencias intragrupo entre la ingesta de Sacarosa y de Vainilla [PBl:  $F(1,26)= 108.69$ ,  $p= 0.001$ ; PBle:  $F(1,26)= 98.69$ ,  $p= 0.001$ ; CeL:  $F(1,26)= 86.32$ ,  $p= 0.001$ ; Control Nx:  $F(1,26)= 52.14$ ,  $p= 0.001$ ; Control Vehículo:  $F(1,26)= 39.89$ ,  $p= 0.001$ ], con una clara preferencia por la Sacarosa (Gráfica 3.18).



**Gráfica 3.18:** Ingesta diferenciada de Vainilla y Sacarosa (10%) de los Grupos Control Veh., Control Nx, CeL, PBI, PBle tras un periodo de privación de agua de 24 h., sin administración subcutánea y durante 30 min.

Sin embargo, sólo los grupos PBI y PBle muestran diferencias significativas en la ingestión de Sacarosa con respecto al grupo Control Nx [PBI:  $F(1,26) = 8.42$ ,  $p = 0.007$ ; PBle:  $F(1,26) = 6.22$ ,  $p = 0.01$ ; CeL:  $F(1,26) = 1.14$ ,  $p = 0.29$ ; Control Vehículo:  $F(1,26) = 0.07$ ,  $p = 0.77$ ] (Gráfica 3.18), manteniéndose así un posible efecto de hiperfagia inducido tras la lesión del Complejo Parabraquial.

## DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en el presente experimento muestran que las lesiones del PBI, del PBle y, en parte, del CeL (Ingesta de Sacarosa en la Fase Experimental I) provocan hiperfagia, cuando se comparan con sus grupos controles, en animales privados de agua pero no de comida. Este estudio demuestra también que la administración de Naloxona disminuye el consumo de sustancias apetitivas (Sacarosa), si bien un análisis más pormenorizado de los datos indica que en animales con elevadas necesidades energéticas (privados) la administración de Nx no reduce el consumo de Sacarosa. Por su parte, la administración de Nx en animales con lesiones del PBI, del PBle o del CeL induce el efecto anoréxico habitual del antagonismo opiáceo sobre la ingestión de Sacarosa, aunque parece que el PBle sería el más implicado en el procesamiento de las propiedades inhibitorias de la Naloxona, ya que

su lesión disminuye parcialmente dicho efecto anoréxico.

Estos resultados son compatibles con los estudios que sugieren que la vía Vagal-Parabraquial-CeL estaría implicada en el procesamiento de la información de origen visceral (Bernard *et al.*, 1993).

En efecto, estudios previos han observado comportamientos hiperfágicos tras lesiones globales del Complejo Parabraquial (Yamamoto *et al.*, 1995), del PBl en particular (Takaki *et al.*, 1990; Zafra *et al.*, 2005) y ahora, más específicamente, del PBle (Experimento 5, presente Tesis Doctoral). Por otra parte, lesiones subtotalet del PBl, que incluyen posiblemente al PBle, pueden inducir también un efecto hiperdípico (Ohman y Johnson, 1986; Edwards y Johnson, 1991; Sakai y Yamamoto, 1998; De Gobbi *et al.*, 2001; De Gobbi *et al.*, 2009). De hecho, algunos estudios han sugerido que el incremento en la ingesta producido por la desactivación del PBl (que incluiría posiblemente al PBle) depende de los mecanismos facilitadores de la ingesta presentes en CeA (Geerling y Loewy, 2006). Por lo tanto, se puede especular sobre la idea de que las lesiones del PBl y, más concretamente, del PBle inducen hiperfagia por producirse un bloqueo del control inhibitorio.

Por otra parte, diversas investigaciones han relacionado también al área parabraquial en procesos recompensantes que implican la modificación específica en el valor reforzante de estímulos gustativos asociados (Berridge, 2003; Simón *et al.*, 2007).

En relación con la ingesta de Sacarosa se ha observado concretamente que los animales lesionados en el CeL reproducen en mayor medida los resultados de hiperfagia y/o ganancia de peso que muestran los animales con lesiones en la Amígdala (Box y Mogenson, 1975; Leonard y Hahn, 1982; Bovetto y Richard, 1995; King *et al.*, 1993a, b; King *et al.*, 1994; King *et al.*, 1996; King *et al.*, 1997; King *et al.*, 1998; King *et al.*, 1999; Rollins y King, 2000; Rollins *et al.*, 2001).

En el presente experimento la lesión del núcleo PBl da lugar, en algunos casos, a efectos hiperfágicos (Fase Agua D./1 y Fase Post-Experimental) mientras que en otras no ocurre así (Fase Experimental I y Fase Agua D./2). Esto contrasta con el efecto que se observa durante todas las fases tras la lesión de una de sus partes (PBle) y que sugiere que “la parte es más efectiva que el todo”, esto es, que la zona crítica puede ser el PBle. Ahora la lesión del PBle ha podido ser más específica, con respecto a la zona crucial implicada en el control de la ingesta, algo que no ocurriría

con las lesiones del PBl que han podido dejar intactas partes del PBle.

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que la administración de antagonistas opiáceos disminuye la ingesta en animales intactos (Lynch y Libby, 1983; Kirkham y Cooper, 1988a, b; Cleary *et al.*, 1996; Giraudo *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1999). Este efecto ha sido reproducido en el presente experimento con respecto a la Ingesta Total (Vainilla+Sacarosa) (Gráfica 3.11).

Levine y su grupo de investigación han observado que los efectos anoréxicos producidos por los antagonistas opiáceos dependen del estado nutritivo del organismo y de la dieta utilizada. De hecho, la Naloxona ejerce poco o ningún efecto sobre la ingesta en animales privados parcialmente de comida (por ejemplo, con el 80 % de su peso corporal) y esto ocurría, según estos autores, porque están “*motivados*” (Weldon *et al.*, 1996). Más aún, se ha observado que en estos animales la Naloxona sólo tiene efecto anoréxico cuando se utiliza comida preferida (Comida Sólida de laboratorio impregnada de Sacarosa), sin afectar a la no preferida (“chow” o aceite de trigo). Por su parte, en animales sin limitaciones de comida, la Naloxona disminuye la ingesta de alimentos independientemente de su preferencia (Weldon *et al.*, 1996). Este hecho sugiere que los opiáceos podrían estar implicados en mayor medida en los aspectos recompensantes de la alimentación (Hipótesis Hedónica) que en los relacionados con las necesidades energéticas (Hipótesis Energética) (Levine y Billington, 1997). En otras palabras, la Naloxona reduciría la ingesta al disminuir las propiedades hedónicas (apetitivas) de la comida (disminución del “Incentivo Estimular”) y no por reducir el déficit energético (hambre).

Sin embargo, en la presente investigación los animales permanecen 24 horas sin agua, pero con comida, lo cual hace que, en cierto modo, también estén privados de comida (los animales con sed tienden a comer menos por razones de homeostasis hídrica), al revés que los animales del grupo de Levine que están privados de comida, pero no de agua. Esto supone que los animales de este presente experimento estarían “*muy motivados*” (en la terminología de Levine) por ingerir la solución de Sacarosa debido a que, además de tener sed y hambre, se les ofrece una sustancia con unas características muy atractivas para su estado nutritivo (hambre, sed y comida líquida). Sin embargo, los animales del grupo de Levine sólo estarían “*motivados*” porque, aunque tienen hambre, no tienen sed, además de ofrecerles la comida en estado sólido (hambre y comida sólida).

De acuerdo con estos planteamientos cabría esperar que en el grupo Control

Naloxona y en los grupos lesionados el efecto anoréxico sobre la Sacarosa sería escaso ya que son animales privados con acceso a comida apetitiva (*muy motivados*).

El análisis de los resultados de la Ingesta Parcial de Sacarosa del presente estudio indica que, en efecto, los animales del grupo Control Nx no muestran una disminución en la ingesta (en la Fase Nx) en comparación con los tres grupos lesionados en este estudio (PBl, PBle y CeL) en los que se observa una supresión de la ingesta de Sacarosa. Las cantidades de Sacarosa consumidas en la Fase Naloxona, por estos tres grupos, son similares a las cantidades de Sacarosa consumida por el grupo Control Naloxona en la Fase 1 (Agua D./1) (Gráfica 3.15). Por lo tanto, la Naloxona, aunque podría haber disminuido las propiedades hedónicas de la Sacarosa (disminución del “Incentivo Estimular”), parece haber eliminado la hiperfagia inducida por las lesiones y, sólo por eso, disminuiría la ingesta de Sacarosa en los grupos lesionados.

Sin embargo, esto no sucede en el grupo PBle que consume una mayor cantidad de Sacarosa que el grupo Control Naloxona, algo que no sucede en el grupo PBl a pesar de que las ingestas con Agua Destilada de los dos grupos parabraquiales son similares. Este hecho permite hipotetizar que las lesiones del PBle han podido afectar, en mayor medida, al efecto anoréxico de la Naloxona que podría procesarse, en parte, a través de este subnúcleo.

En cualquier caso, es probable que las lesiones del PBl puedan haber afectado al PBle parcialmente, a diferencia de lo que cabría esperar de las lesiones cuyo objetivo era el PBle particularmente. Esta idea es compatible con los resultados de otros estudios que muestran un efecto hiperfágico tras las lesiones totales del PBl (Ohman y Johnson, 1986, 1989; Edwards y Ritter, 1989; Takaki *et al.*, 1990; Edwards y Johnson, 1991; Zafra *et al.*, 2005), aunque sin hacer mención a ninguno de los múltiples subnúcleos existente (alrededor de siete) (Fulwiler y Saper, 1984; Paxinos y Watson, 1986). Este estudio centra su atención en el Subnúcleo Parabraquial Lateral Externo (PBle) y propone que tanto el efecto hiperfágico como la acción anoréxica de la Naloxona podrían prescribirse específicamente a través de este subnúcleo pontino.

En este contexto, un examen de los datos ofrecidos por los experimentos que han puesto de manifiesto las múltiples áreas anatómicas relacionadas con la ingesta de comida, por ejemplo, después de la administración de agentes anoréxicos y orexigénicos, permiten comprobar que entre todas esas áreas “marcadas” se incluye

el PBl (Li y Rowland, 1993, 1994, 1995; Ritter *et al.*, 1994; Elmquist *et al.*, 1997; 1998; Rowland *et al.*, 2000; Trifunovic y Reilly, 2001; Cheng *et al.*, 2011). Más aún, algunos estudios inmunohistoquímicos, por ejemplo, incluyen al PBle (entre otros muchos) como uno de los centros activados tras la administración periférica de productos generadores de glucoprivación (por ejemplo, 2,5-AM) (Ritter *et al.*, 1994) y con glucosa administrada intraduodenalmente (Wang *et al.*, 1999), un efecto que resulta eliminado mediante Vagotomías (Ritter *et al.*, 1994; Calingasan y Ritter, 1993). De hecho, las lesiones del PBl (que incluyen al PBle) bloquean las acciones de estos agentes farmacológicos o endocrinos sobre la ingesta (Calingasan y Ritter, 1993; Trifunovic y Reilly, 2001; Becskei *et al.*, 2007).

Más aún, péptidos reguladores del consumo de los principales macro-nutrientes, como el NP-Y (carbohidratos), la Galanina (grasas) y la ‘hormona liberadora de la hormona del crecimiento’ (proteínas), son procesados por redes de núcleos entre los cuales también se incluye el PBle (Smith *et al.*, 1985; Petrov *et al.*, 1992a; 1992b; Krukoff *et al.*, 1993; Veening *et al.*, 1998; Koegler *et al.*, 1999; Bray, 2000).

El Complejo Parabraquial está densamente innervado por vías extrínsecas y neuronas intrínsecas que sintetizan neuropéptidos opiáceos (Finley *et al.*, 1981; Fallon y Leslie, 1986; Standaert *et al.*, 1986; Moga *et al.*, 1990; Riche *et al.*, 1990; Carr *et al.*, 1991; Moufid-Bellancourt *et al.*, 1996; Wolinsky *et al.*, 1996; Gutstein *et al.*, 1998; Chamberlin *et al.*, 1999; Martin-Schild *et al.*, 1999; Engström *et al.*, 2001). Concretamente, en el PBl se han detectado la presencia de una alta densidad de receptores opiáceos  $\mu$ ,  $\delta$  y  $k$  (Atweh y Kuhar, 1977; Lynch *et al.*, 1985; Sales *et al.*, 1985; Mansour *et al.*, 1988, 1995b; Ding *et al.*, 1996; Chamberlin *et al.*, 1999), con una mayor concentración de receptores  $\mu$  en los núcleos PBle, PBl central y PBm, mientras que los sistemas del tipo  $\delta$  y  $k$  han sido localizados tanto en la zona PBl dorsal como en PBl ventral (Lynch *et al.*, 1985; Mansour *et al.*, 1988, 1995b; Ding *et al.*, 1996). Por lo tanto, la posibilidad de que la lesión del PBle haya podido atenuar la acción anoréxica de la Naloxona es compatible con los datos que relacionan al PBl con el Sistema Opiáceo.

En resumen, los resultados del presente experimento muestran que las lesiones del PBl, del PBle y, en parte, del CeL generan hiperfagia de sustancias apetitivas probablemente a través de su acción sobre algunos de los componentes neurales regulatorios implicados bien en los procesos de Saciación o bien en los procesos hedónicos. Este efecto hiperfágico se reduce tras la administración de Naloxona, un

fármaco antagonista opiáceo que reduce las propiedades hedónicas y/o post-ingestivas de los nutrientes apetitivos y que se expresa a través de una disminución en la ingesta después de las lesiones. Sin embargo, esta acción anoréxica de la Naloxona puede ser parcialmente contrarrestada por las lesiones del PBle que atenúan el efecto inhibitorio sobre la ingesta.





**CAPÍTULO IV:**

**RELEVANCIA OPIÁCEA EN EL APRENDIZAJE AVERSIVO  
GUSTATIVO CONCURRENTENTE Y SECUENCIAL: EFECTOS DE  
LA NALOXONA**



En general, el AAvG se podría definir como la capacidad adquisitiva de los animales para evitar o rechazar un estímulo gusto-olfatorio que ha sido asociado previamente con malestar visceral.

Se han propuesto diversas modalidades de Aprendizaje Interoceptivo Gustativo, cada una con diferentes características fisiológicas y comportamentales (Arnedo *et al.*, 1990; 1991; Gallo *et al.*, 1992; Agüero *et al.*, 1993a, b; Agüero *et al.*, 1997; Mediavilla *et al.*, 1998, 1999, 2001, 2005) y que, a su vez, implicarían circuitos neuroanatómicos independientes (García *et al.*, 1985; Kiefer, 1985; Chambers, 1990; García, 1990; Mediavilla *et al.*, 2001, 2005).

Estas dos modalidades de Aprendizajes Interoceptivos Gustativos son, al parecer, no redundantes en cuanto a su adquisición ya que utilizarían dos mecanismos independientes de procesamiento visceral los cuales serían activados en función de las características específicas de los estímulos viscerales y del protocolo experimental utilizado. Estas dos modalidades de aprendizaje han sido denominadas AAvG Concurrente y AAvG Secuencial (Arnedo *et al.*, 1990, 1991; Gallo *et al.*, 1992; Agüero *et al.*, 1993a, b; Agüero *et al.*, 1997; Mediavilla *et al.*, 1998, 1999, 2001, 2005).

En el caso del primero de ellas (Concurrente) utilizarían un mecanismo de detección y procesamiento neural rápido de los estímulos de carácter tóxico que ingresan en el organismo. Así, este mecanismo neural permitiría el rechazo de los estímulos gusto-olfatorios que generan malestar (Arnedo y Puerto, 1986; Arnedo *et al.*, 1990, 1991; Arnedo *et al.*, 1993) y que requieren de la existencia de receptores gástricos que permitan la detección inmediata del estímulo visceral (Arnedo *et al.*, 1991).

Con respecto al AAvG Secuencial, esta modalidad utilizaría un mecanismo humoral más lento para la detección de los estímulos viscerales el cual, a su vez, implicaría un proceso de absorción de los productos presentes en el sistema digestivo. Una vez absorbidos, y ya en el torrente sanguíneo, estas sustancias serían transportadas al SNC, donde podrían ser detectadas, presumiblemente, por estructuras circunsventriculares quimiorreceptoras. Estos quimiorreceptores pueden detectar la potencial peligrosidad/recompensa del estímulo visceral ingerido o administrado, activando conductas de defensa/acercamiento, así como diversas reacciones de índole interna (Gallo *et al.*, 1988; Agüero *et al.*, 1993b).

En el AAvG Concurrente, el Nervio Vago sería el sistema sensorial interoceptivo capaz de detectar rápidamente, a nivel visceral, la presencia de sustancias aversivas/apetitivas en el sistema gastrointestinal. Por su parte, la Vía Humoral procesa todos los productos que ingresan en el organismo incluidos aquellos que, por sus características peculiares, no pudieron ser detectados neuralmente en el sistema gastrointestinal (Ritter *et al.*, 1980; Ladowsky y Ossenkopp, 1986; Gallo *et al.*, 1991; Bernstein *et al.*, 1992).

El hecho de que estas dos modalidades experimentales requieran para manifestarse de diferentes procedimientos, vías anatómicas, número de ensayos para la adquisición y diferente grado de flexibilidad (Mediavilla *et al.*, 2001), sugiere que se trataría de diferentes procesos de adquisición, de diferentes modalidades de aprendizaje, si bien el resultado final, en ambos casos, es evitar/rechazar uno de los estímulos gusto-olfatorios. Se ha propuesto que estas dos modalidades de aprendizaje podrían ser distinguidas teóricamente y así, mientras el AAvG Concurrente (aprendizaje incremental, contigüidad estimular, rigidez, etc.) podría ser considerado como un ejemplo de Aprendizaje Implícito, el AAvG Secuencial (un solo ensayo, demora inter-estimular, flexibilidad, etc.) podría incluirse entre los Aprendizajes Explícitos (Mediavilla *et al.*, 2001).

En efecto, existe el convencimiento de que en los procesos de aprendizaje y memoria parecen existir distintas formas de adquisición y retención (Squire y Cohen, 1984). Las capacidades de memoria preservadas o impedidas tanto en animales lesionados (Eichenbaum *et al.*, 1986; Eichenbaum *et al.*, 1989) como en pacientes amnésicos (Milner, 1972) apoya la existencia de más de una modalidad de memoria (Squire y Cohen, 1984). Squire y Cohen (1984) distinguen entre un Sistema de Memoria Declarativo y un Sistema Procedimental. El Sistema de Memoria Declarativo (Explícito) sería accesible al recuerdo consciente e incluye hechos, episodios, listas, relaciones e itinerarios de la vida cotidiana, relaciones entre múltiples índices, es decir, es “saber qué”. Por su parte, el Sistema de Memoria Procedimental (Implícito) hace referencia a habilidades o destrezas perceptivas y motoras adquiridas, y a las que sólo podemos acceder mediante la acción, a través de la activación de un procedimiento particular, de un sistema de acción abordado en las mismas circunstancias originales, es decir, es “saber cómo”.

En este contexto, los sistemas neuroquímicos implicados en estos procesos de aprendizaje están por determinar. El hecho de que los antagonistas opiáceos

bloqueen la adquisición o expresión de preferencias por la dieta (Levine *et al.*, 2002) o, al menos, reduzcan la preferencia por soluciones apetitosas como la Sacarina o la Sacarosa sugieren una potencial relevancia de este neurotransmisor en el aprendizaje de índole visceral (Le Magnen *et al.*, 1980; Levine *et al.*, 1982; Le Magnen, 1992; Agmo *et al.*, 1995). Sin embargo, experimentos llevados a cabo por Bodnar y Sclafani concluyen que los antagonistas opiáceos no interfieren en el desarrollo de preferencias gustativas aprendidas. Más aún, se ha comprobado que si bien el antagonismo opiáceo disminuye la ingesta de los sabores asociados a la Sacarosa no afecta sin embargo a la adquisición ni a la expresión de las preferencias (Yu *et al.*, 1999; Azzara *et al.*, 2000; Frisina y Sclafani, 2002; Baker *et al.*, 2004).

Cuando se utilizan procedimientos de aprendizaje tales como el Condicionamiento de Preferencia hacia un Lugar (CPL), se observa que los antagonistas opiáceos inhiben la expresión pero no el aprendizaje del lugar preferido asociado con la Sacarosa (Delameter *et al.*, 2000). Así, los antagonistas opiáceos administrados después de la adquisición reducen el tiempo de permanencia en el compartimento asociado a la Sacarosa pero, sin embargo, la administración del antagonista durante la adquisición no impide las preferencias inducidas por el lugar.

En esta misma línea se ha comprobado que los antagonistas opiáceos, además de provocar aversión por el lugar con el que se asocian (CAL), bloquean el CPL inducido por morfina (Mucha *et al.*, 1982; Del Pozo *et al.*, 1996; Shippenberg y Elmer, 1998; Manzanedo *et al.*, 2001b). Más aún, en animales transgénicos, carentes de receptores  $\mu$ , la morfina no induce CPL (Matthes *et al.*, 1996).

Procedimentalmente la distinción entre la modalidad Concurrente (a Corto Plazo/Implícito) y Secuencial (a Largo Plazo/Explícito) se estableció con tareas de AAvG, sin embargo esta disociación también puede establecerse en pruebas de CPL. Ahora bien, dado que ambas modalidades de aprendizaje (Concurrente y Secuencial) se sustentan en distintos sistemas neurales (Gallo *et al.*, 1991; Arnedo *et al.*, 1993; Agüero *et al.*, 1993; Mediavilla *et al.*, 2001, 2005), también es probable que sean procesadas por distintos sistemas neuroquímicos y que el Sistema Opiáceo esté implicado en una y no en otra modalidad, sea Concurrente o Secuencial.

En este contexto, la administración intraoral de sustancias nutritivas induce preferencias olfatorias que pueden ser bloqueadas mediante antagonistas opiáceos (Shide y Blass, 1991). Esta vía intraoral de administración del reforzador permite una

detección rápida, una de las características distintivas de la modalidad del aprendizaje Concurrente.

También las preferencias Concurrentes por un lugar inducidas mediante Estimulación Eléctrica Intracerebral, y utilizada en experimentos previos, son bloqueadas mediante la administración de un antagonista opiáceo (Simón *et al.*, 2007; Experimento 3, presente Tesis Doctoral).

De acuerdo con estos datos, el presente Capítulo propone que los antagonistas opiáceos (Naloxona) podrían deteriorar la adquisición (y no la retención/expresión) de tareas de AAvG Concurrente (y no AAvG Secuencial) probablemente al interrumpir el procesamiento de la información visceral vagal rápida transmitida a través de la utilización del Sistema Opiáceo.

Concretamente, este Capítulo pretende examinar la controversia existente en torno a la relevancia de los antagonistas opiáceos en los procesos de aprendizaje y memoria. Así, se intentará disociar la implicación de las dos modalidades de AAvG (Concurrente y Secuencial) en relación con el Sistema Opiáceo utilizando para ello la administración subcutánea de Naloxona (4 mg/kg.).

En este Capítulo, que consta de 3 experimentos, se analiza la adquisición y retención/expresión del AAvG de animales a los que se les ha administrado Naloxona. Así, en el Experimento 8 se utiliza el procedimiento del AAvG Concurrente, a través de tres grupos: 1) un grupo en el que la Naloxona es inyectada en todos los ensayos de adquisición, 2) un segundo grupo al que la Naloxona le es administrada solamente durante los dos primeros ensayos adquisitivos y 3) un tercer grupo al que se le administra el Vehículo (agua destilada) durante todo el proceso de aprendizaje. En este experimento se llevaron a cabo siete ensayos de adquisición. En el 8º día los animales fueron sometidos a una Prueba de Discriminación, sin administración alguna. Finalmente, en el 9º día se realizó un test de flexibilidad en el que los estímulos gusto-olfatorios fueron invertidos posicionalmente.

En el Experimento 9 se analizaron los efectos de la Naloxona en una prueba de retención/expresión después de un AAvG Concurrente.

Por último, en el Experimento 10 se siguió el procedimiento habitual de la modalidad Secuencial del AAvG con administración subcutánea de Naloxona durante los ensayos de adquisición.

## **EXPERIMENTO 8: Relevancia Opiácea en el Aprendizaje Aversivo Gustativo Concurrente (a Corto Plazo/Implícito): Efectos de la Naloxona.**

Investigaciones previas llevadas a cabo por este laboratorio han demostrado que el AAvG Concurrente parece depender del eje neuroanatómico Vago-NTS-PBle-CeA. En efecto, la integridad del Nervio Vago parece esencial para el aprendizaje de la modalidad Concurrente (pero no para la Secuencial) del AAvG, y así los distintos tipos de Vagotomías interrumpen el AAvG Concurrente inducido mediante administración de NaCl hipertónico (Arnedo y Puerto, 1986; Arnedo *et al.*, 1989, 1990, 1991; Arnedo *et al.*, 1993; Zafra *et al.*, 2006), además de, por ejemplo, incrementar la latencia de respuesta emética a Sulfato de Cobre (Coil *et al.*, 1978).

Se ha propuesto que, en esta modalidad Concurrente, los mecanismos vagales para la detección visceral ofrecen información rápida sobre las características químicas de los estímulos presentes en el sistema gastrointestinal y de esta manera permite discriminar y reaccionar rápidamente sobre la conducta pertinente de ingesta o rechazo de los alimentos.

El procedimiento experimental habitual en las tareas de AAvG Concurrente implican la presentación de dos estímulos gusto-olfatorios, uno de los cuales es asociado con la administración intragástrica simultánea de un estímulo nocivo (por ejemplo, NaCl hipertónico), mientras que el otro estímulo gusto-olfatorio es asociado con la inyección un estímulo inocuo (por ejemplo, Suero Fisiológico) (Tabla 1.2). Como en la mayoría de los procesos adquisitivos implícitos, este tipo de tareas requiere de varios ensayos para que las tareas puedan ser aprendidas.

Más allá de la implicación del Nervio Vago, la modalidad Concurrente del AAvG también puede ser bloqueada mediante lesiones en el Núcleo del Tracto Solitario (Madiavilla *et al.*, 2011), PBle (Mediavilla *et al.*, 2000), PBm (Agüero *et al.*, 1997), CeA (Experimento 2, presente Tesis Doctoral) así como en varias regiones del circuito cerebelar (Mediavilla *et al.*, 1998, 1999).

En efecto, existen estudios que también incluyen, dentro de este sistema, a la conexión PBle-CeA (Simón *et al.*, 2007; Capítulo II y III, presente Tesis Doctoral). Así, se ha demostrado que la Estimulación Eléctrica del PBle induce conductas de aversión tanto hacia los estímulos gusto-olfatorios (Simón *et al.*, 2007) como hacia los lugares asociados (Simón *et al.*, 2007; Experimento 4, presente Tesis Doctoral), unos



efectos que pueden ser bloqueados mediante la administración de Naloxona (Simón *et al.*, 2007; Experimento 4, presente Tesis Doctoral). Resultados similares se han observado en otros laboratorios en los que se ha logrado bloquear las preferencias espaciales inducidas por comida con antagonistas tanto opiáceos como dopaminérgicos (Agmo *et al.*, 1995; Tzschentke, 1998).

Por otro lado, dado que las lesiones del PBle disminuyen la acción anoréxica de la Naloxona (Experimento 7, presente Tesis Doctoral) y que este subnúcleo está implicado en los procesos adquisitivos a Corto Plazo al formar parte del eje anatómico Concurrente, cabría esperar que el Sistema Opiáceo desempeñara una función relevante en este sistema cerebral y en sus manifestaciones comportamentales (Bechara *et al.*, 1993; Rabin *et al.*, 1985).

Así, y de acuerdo con estos planteamientos, se podría proponer que la Naloxona puede afectar el proceso de adquisición de una tarea de AAvG Concurrente posiblemente al interrumpir la información visceral vagal relevante que implicaría al Sistema Opiáceo y presumiblemente al PBle.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

### **SUJETOS**

Se utilizaron 34 ratas de la raza Wistar cuyos pesos estuvieron comprendidos entre 302 y 363 gr. al principio del experimento. Durante el procedimiento experimental se excluyeron 7 animales al desprendérseles alguna de las fístulas intragástricas. Los 27 animales restantes fueron aleatoriamente asignados a tres grupos: 1) un Grupo Naloxona Total (10 animales), al que se le administró subcutáneamente Naloxona (4 mg/kg.) durante los siete días del periodo adquisitivo (7 días Nx); 2) un Grupo Naloxona Parcial (10 animales), al que sólo se le administró Naloxona durante los dos primeros días adquisitivos y Vehículo (agua destilada) en los cinco días posteriores (2 días Nx); y 3) un Grupo Control (7 animales), al que se le administró Vehículo durante todos los días del periodo de aprendizaje (0 días Nx).

Adicionalmente, en el 8º día los tres grupos fueron sometidos a una Prueba de Discriminación, sin administración alguna. Finalmente, en el 9º día se llevó a cabo una Prueba de Inversión.

Los animales fueron alojados individualmente en jaulas de metacrilato de 30x15x30 y fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura, oscilando entre 22°-24°, con ciclos de luz-oscuridad de 12:12 horas y con libre acceso a agua y comida (Panlab, S.L., Barcelona).

## **PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO**

A todos los animales del presente experimento se les implantaron 2 catéteres intragástricos de manera análoga a la descrita en el Experimento 1 de la presente Tesis Doctoral.

## **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

El protocolo experimental de AAvG Concurrente es idéntico al descrito en el Experimento 2, con algunas diferencias que se describen a continuación. Así, durante el procedimiento adquisitivo al Grupo Naloxona Total (7 días Nx) y al Grupo Control (0 días Nx) se les administra Naloxona y Vehículo (agua destilada), respectivamente, durante los siete días adquisitivos, mientras que al Grupo Naloxona Parcial (2 días Nx) recibe Naloxona durante 2 días y agua destilada durante los 5 días restantes.

La administración de Naloxona se produce 20 minutos antes del periodo comportamental.

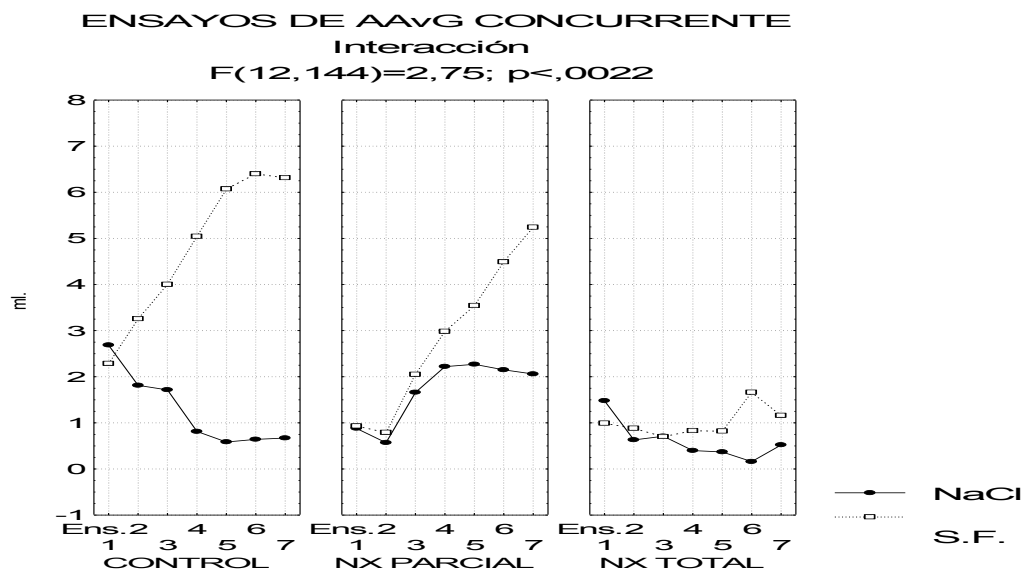
También a diferencia del AAG Concurrente utilizado en estudios previos, ahora, en una sesión adicional (8° día), se somete a los animales a una Prueba de Discriminación sin administración adicional alguna (Fase II), y en ella se les ofrece a elegir a los animales entre los dos sabores habituales y en la misma posición que se utilizó durante el periodo de adquisición, sin que recibieran administración adicional alguna (ni i.g. ni s.c.).

Para finalizar, en el 9° día los animales son sometidos a una Prueba de Inversión (Mediavilla *et al.*, 2001) (Fase III), en la cual los dos estímulos gusto-olfatorios son ofrecidos, ahora con las posiciones intercambiadas, también sin administración i.g. ni s.c. Esta prueba pretende dilucidar la estrategia utilizada por los animales a la hora de realizar la tarea, es decir, si han utilizado una estrategia Implícita (rígida) o Explícita (flexible) a la hora de evitar el estímulo gusto-olfatorio asociado a la administración de NaCl hipertónico (Mediavilla *et al.*, 2001).

## RESULTADOS

a) Fase I (7 días):

Resultados del desarrollo (7 días) del AAVG Concurrente del presente experimento (Gráfica 4.1):



**Gráfica 4.1:** Media diaria de las cantidades consumidas del estímulo gusto-olfatorio asociado a NaCl hipertónico o a Suero Fisiológico Isotónico por parte del Grupo Control (0 días Nx), del Grupo Naloxona Parcial (2 días Nx) y del Grupo Naloxona Total (7 días Nx) en una tarea de AAVG Concurrente (a Corto Plazo).

El ANOVA realizado para determinar los efectos del aprendizaje demuestra que existe una interacción entre grupos [ $F(12, 144)= 2.75, p<0.002$ ]. De hecho, existen diferencias significativas entre el Grupo Control y el Grupo Naloxona Parcial [ $F(1, 24)= 11.66, p<0.002$ ], entre el Grupo Control y el Grupo Naloxona Total [ $F(1, 24)= 102.18, p<0.001$ ] y entre el Grupo Naloxona Parcial y el Grupo Naloxona Total [ $F(1, 24)= 54.40, p<0.001$ ].

Los datos del Grupo Control (0 días Nx), del Grupo Naloxona Parcial (2 días Nx) y del Grupo Naloxona Total (7 días Nx) se analizaron mediante un ANOVA con medidas repetidas (Sustancia x Días). En el Grupo Control (0 días Nx) resultó estadísticamente significativo tanto el efecto Días [ $F(6, 36) = 3.48, p<0.001$ ], como el efecto Sustancia [ $F(1, 6)= 17.30, p<0.001$ ], así como la interacción Sustancia x Días [ $F(6, 36) = 9.45, p<0.001$ ]. También, en el Grupo Control la interacción

Sustancia x Días ya fue estadísticamente significativa en el 5° día [ $F(1, 24) = 14.49$ ,  $p < 0.001$ ], reproduciendo así los resultados obtenidos en los Grupos de Control del Experimento 2 de la presente Tesis Doctoral.

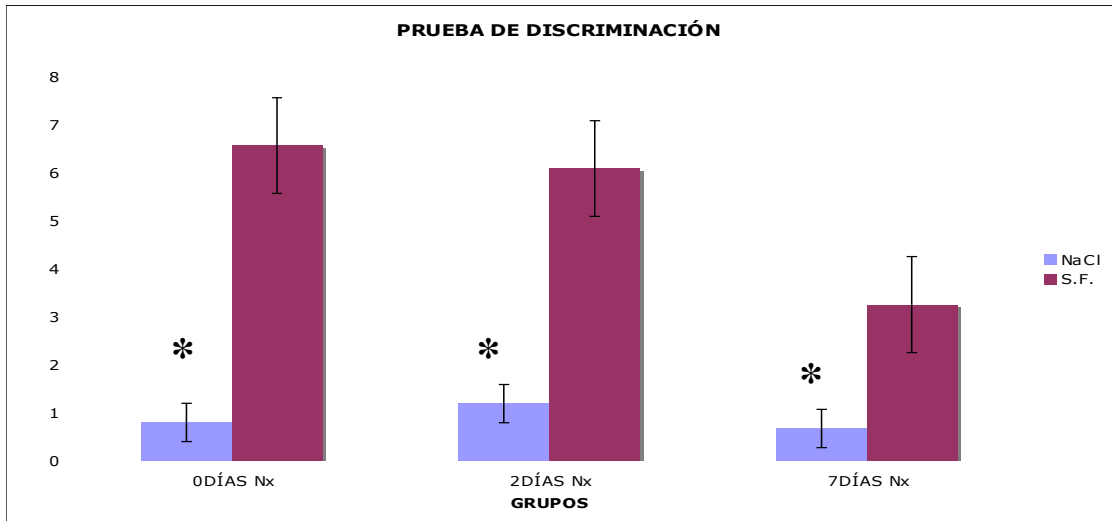
Por su parte, el Grupo Naloxona Parcial (2 días Nx), aunque no mostró diferencias significativas en el efecto Sustancia [ $F(1, 9) = 2.18$ ,  $p < 0.17$ ], sí las mostró en el efecto Días [ $F(6, 54) = 34.90$ ,  $p < 0.001$ ] y en la interacción Días x Sustancia [ $F(6, 54) = 3.13$ ,  $p < 0.01$ ] durante los 7 días adquisitivos. Aún más, el Grupo Naloxona Parcial también mostró diferencias significativas en el efecto Días [ $F(4, 36) = 11.78$ ,  $p < 0.001$ ] como en la interacción Días x Sustancia [ $F(4, 36) = 4.36$ ,  $p < 0.011$ ], pero no en el efectos Sustancia [ $F(1, 9) = 2.34$ ,  $p < 0.015$ ], cuando se tienen en cuenta sólo los últimos 5 días adquisitivos sin Naloxona (del día 3 al 7) [ $F(1, 24) = 4.46$ ,  $p < 0.03$ ], por lo que finalmente lograron aprender correctamente la tarea discriminativa aunque para ello necesitaran 2 días más que el Grupo Control. En otras palabras, los 2 primeros días con Naloxona en los animales no se produjo adquisición.

Finalmente, el Grupo Naloxona Total (7 días Nx) mostró diferencias significativas en el efecto Días [ $F(6, 54) = 3.38$ ,  $p < 0.001$ ] y Sustancias [ $F(1, 9) = 6.33$ ,  $p < 0.03$ ], pero no en la interacción Días x Sustancias [ $F(6, 54) = 2.26$ ,  $p < 0.05$ ].

En cualquier caso, la administración de Naloxona siempre reduce significativamente la ingesta según se deduce de las diferencias producidas en las cantidades totales consumidas durante el primer ensayo (1° día) entre el Grupo Control y los dos Grupos Naloxona [Grupo Control vs. Grupo Naloxona Parcial:  $F(1, 24) = 29.98$ ,  $p < 0.001$ ; Grupo Control vs. Grupo Naloxona Total:  $F(1, 24) = 18.76$ ,  $p < 0.001$ ]. Lo mismo sucede al comparar las cantidades totales ingeridas en el día 2 (con Naloxona) y el día 3 (sin Naloxona) en el Grupo Naloxona Parcial [ $F(1, 24) = 34.43$ ,  $p < 0.001$ ].

b) Fase II (Prueba Discriminación sin administración):

Los resultados de la Prueba de Discriminación, que se llevó a cabo en el día 8° (sin administración ni de Naloxona ni de productos intragástricos), se presentan en la Gráfica 4.2:

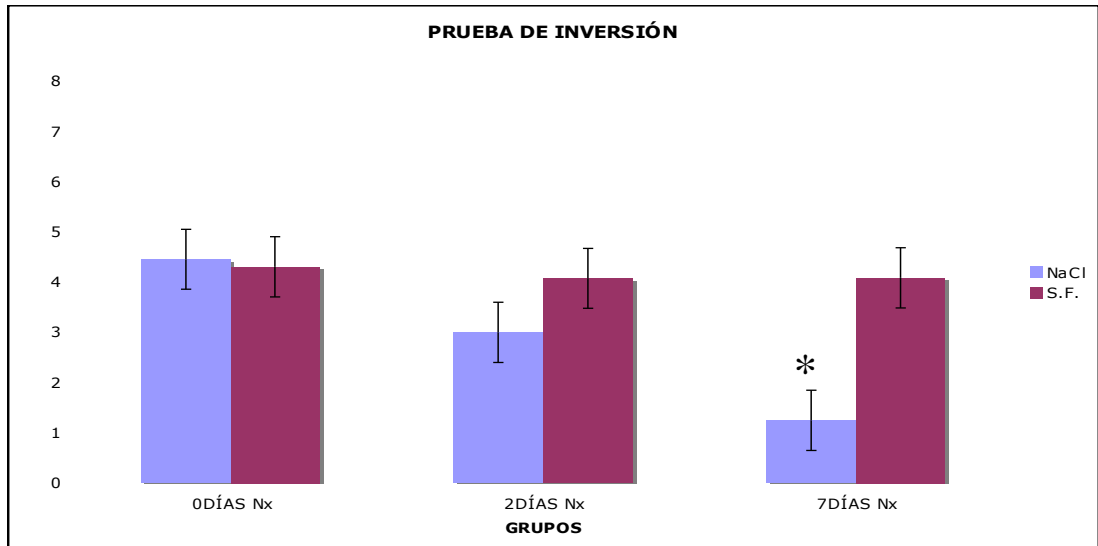


**Gráfica 4.2:** Media de las cantidades consumidas del estímulo gusto-olfatorio asociado a NaCl hipertónico y a Suero Fisiológico Isotónico del Grupo Control (0 días Nx), del Grupo Naloxona Parcial (2 días Nx) y del Grupo Naloxona Total (7 días Nx) en la Prueba de Discriminación (sin administración alguna) del 8° día.

El análisis de la ingesta media de los estímulos gusto-olfatorios asociados con NaCl hipertónico y Suero Fisiológico en el 8° día (sin administración ni de la Naloxona ni de NaCl) mostraron diferencias significativas en los tres grupos de la presente investigación [Grupo Control:  $F(1, 24) = 39.35$ ,  $p < 0.001$ ; Grupo Naloxona Parcial:  $F(1, 24) = 40.49$ ,  $p < 0.001$ ; Grupo Naloxona Total:  $F(1, 24) = 11.26$ ,  $p < 0.001$ ], esto es, los tres grupos habrían adquirido y retenido el AAvG Concurrente llevado a cabo previamente.

c) Fase III (Prueba de Inversión):

Finalmente, los resultados de la Prueba de Inversión, esto es modificando las posiciones en las que los estímulos gusto-olfatorios habían sido ofrecidos durante el aprendizaje, se presentan en la Gráfica 4.3:



**Gráfica 4.3:** Media de las cantidades ingeridas del estímulo gusto-olfactorio asociado a NaCl hipertónico y a Suero Fisiológico Isotónico del Grupo Control (0 días Nx), del Grupo Naloxona Parcial (2 días Nx) y del Grupo Naloxona Total (7 días Nx) durante la Prueba de Inversión en la que las posiciones previas de los estímulos gusto-olfactorios fueron intercambiadas.

El análisis de las cantidades medias ingeridas de los estímulos gusto-olfactorios asociados con NaCl hipertónico y Suero Fisiológico en la Prueba de Inversión muestran que ni el Grupo Control [ $F(1, 24) = 0.008, p < 0.92$ ] ni el Grupo Naloxona Parcial [ $F(1, 24) = 0.67, p < 0.42$ ] superaron con éxito dicha tarea de inversión. Estos resultados sugieren que, probablemente, el aprendizaje se habría desarrollado de manera Implícita (Mediavilla *et al.*, 2001). Sin embargo, este no parece ser el caso del Grupo Naloxona Total que mantuvo y transfirió el aprendizaje a pesar de las modificaciones introducidas, un proceso adquisitivo con características Explícitas (Mediavilla *et al.*, 2001). Así lo demuestran las diferencias estadísticamente significativa entre los estímulos gusto-olfactorios en sus nuevas posiciones [ $F(1, 24) = 4.47, p < 0.03$ ].

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente experimento muestran que la administración de Naloxona disminuye la ingesta de los animales y aparentemente sugieren también que no se impide la adquisición de una tarea de AAVG según la modalidad Concurrente.

Esta conclusión sería compatible con los estudios que han observado que los antagonistas opiáceos, aunque disminuyen la ingesta de las sustancias apetitivas durante los ensayos de adquisición, no impide el desarrollo de preferencias gustativas (Yu *et al.*, 1999; Azzara *et al.*, 2000; Frisina y Sclafani, 2002; Baker *et al.*, 2004). Más

aún, utilizando pruebas de Condicionamiento hacia un Lugar se ha demostrado que el antagonismo opiáceo inhibe la expresión, pero no la adquisición, del aprendizaje de un lugar asociado con Sacarosa (Delameter *et al.*, 2000).

Conviene recordar, sin embargo, que la mayoría de estos estudios citados utilizan un protocolo experimental Secuencial para inducir las preferencias, a pesar de que, desde la perspectiva seguida por la presente investigación, ambas modalidades de aprendizaje (Concurrente y Secuencial) se sustentan en sistemas neurales funcionalmente diferentes (Arnedo *et al.*, 1990, 1991; Gallo *et al.*, 1992; Garcia, 1990; Agüero *et al.*, 1993a, b; Agüero *et al.*, 1997; Mediavilla *et al.*, 1998, 1999, 2001, 2005). Es incluso probable que también estén procesadas por sistemas neuroquímicos distintos, con lo cual existe la posibilidad de que el Sistema Opiáceo esté implicado en una modalidad y no en la otra.

De hecho, se ha observado, mediante estudios neuroquímicos, que la administración de Naloxona disminuye la activación típica mostrada por el PBL tras la inyección de un producto nocivo que genera inmunodepresión (Interleucina 1- $\beta$ ) (Buller *et al.*, 2005), por lo que el antagonismo opiáceo podría bloquear la adquisición del AAvG Concurrente por su acción inhibitoria sobre este eje anatómico, que se sabe está implicado en dicha modalidad de aprendizaje (Mediavilla *et al.*, 2000; Simón *et al.*, 2007). Por el contrario, la administración de Naloxona aumenta la activación típica mostrada por el AP tras la inyección de este producto nocivo (Buller *et al.*, 2005), lo que sugiere que el antagonismo opiáceo podría facilitar la adquisición del AAvG Secuencial por su acción activadora sobre esta estructura, que se sabe está implicada en dicha modalidad de aprendizaje (Mediavilla *et al.*, 2000; Simón *et al.*, 2007)

En esta línea, y al examinar detalladamente los resultados del presente experimento, se comprueba que el Sistema Opiáceo podría estar implicado, de algún modo, en los procesos adquisitivos a Corto Plazo (Concurrente/Implícito). En efecto, el proceso adquisitivo del Grupo Naloxona Parcial (los dos primeros días adquisitivos con Naloxona) se retrasa significativamente con respecto al Grupo Control que ya en el 5º día logró aprender la tarea (Experimento 2 de la presente Tesis Doctoral). Por lo tanto, esto puede significar que los dos primeros ensayos de aprendizaje podrían haber quedado inutilizados por la administración de Naloxona. Por su parte, el Grupo Naloxona Total no aprende la tarea a lo largo de los 7 días adquisitivos. Las diferencias estadísticas significativas que se han producido al

comparar el Grupo Naloxona Total y el Grupo Naloxona Parcial, o ambos, con respecto al Grupo Control irían en esta dirección.

Ahora bien, los resultados de la Prueba de Discriminación (8º día) parecen contradictorios con lo afirmado en el párrafo anterior ya que todos los grupos retienen el aprendizaje, esto es, todos discriminan adecuadamente en la tarea propuesta, a pesar de las diferencias observadas durante el proceso de adquisición.

Sin embargo, la Prueba de Inversión, esto es, el cambio en la posición de las buretas de los sabores, parece ser relevante, ya que esta prueba permite disociar la modalidad adquisitiva utilizada por los animales, Implícita (Concurrente/a Corto Plazo) o Explícita (Secuencial/a Largo Plazo) (Mediavilla *et al.*, 2001, 2005). En este test se observa que sólo el Grupo Naloxona Total (los 7 días adquisitivos con Naloxona) realiza correctamente (9º día) la tarea discriminativa, lo cual sugiere que en este Grupo el aprendizaje parece haber sido adquirido de manera Explícita. No ocurre así ni con el Grupo Naloxona Parcial ni con el Grupo Control, que no retienen lo aprendido en la Prueba de Inversión, lo cual permite suponer que estos animales aprendieron la tarea de manera Implícita.

La estrategia comportamental utilizada por los animales del Grupo Naloxona Total para adquirir esta tarea de manera Explícita, cuando el protocolo experimental utilizado es manifiestamente Implícito (Concurrente), está por determinar. Es probable que el hecho de que los animales de este grupo consuman pequeñas cantidades de los dos sabores y en algunos ensayos de sólo uno de ellos (característica distintiva del aprendizaje Secuencial) (Mediavilla *et al.*, 2001, 2005), podría permitir un uso explícito de la información a pesar de que habitualmente este protocolo es resuelto de manera implícita. En otras palabras, la acción anoréxica de la Naloxona permite/obliga a los animales a adquirir de manera explícita una tarea Concurrente (Implícita), utilizando aquella información que esté a su alcance para así poder resolver satisfactoriamente la exigente situación a la que han sido expuestos.

En este sentido existen estudios que muestran cómo el antagonismo opiáceo bloquea las preferencias olfatorias inducidas por la administración intraoral (i.o.) de sustancias nutritivas (Shide y Blass, 1991), una vía de administración del reforzador que hace posible su detección de manera rápida (característica distintiva de la modalidad Concurrente), al igual que ocurre con la detección del NaCl hipertónico administrado intragástricamente (Arnedo y Puerto, 1986; Arnedo *et al.*, 1989, 1990, 1991; Arnedo *et al.*, 1993; Agüero *et al.*, 1997; Mediavilla *et al.*, 1998, 1999, 2000, 2001,



2005; Experimento 2, presente Tesis Doctoral) y la Estimulación Eléctrica reforzante (Simón *et al.*, 2007; Capítulo II, presente Tesis Doctoral).

Igualmente, se ha demostrado que los antagonistas opiáceos bloquean también tanto la adquisición como la expresión de preferencias por la dieta (Le Magnen *et al.*, 1980; Levine *et al.*, 1982; Le Magnen, 1992; Agmo *et al.*, 1995; Levine *et al.*, 2002). Más aún, utilizando tareas de Condicionamiento hacia un Lugar se ha observado que tanto el bloqueo opiáceo en animales intactos (Mucha *et al.*, 1982; Del Pozo *et al.*, 1996; Shippenberg y Elmer, 1998; Manzanedo *et al.*, 2001b) como la utilización de ratones transgénicos que carecen de receptores opiáceos  $\mu$  (Matthes *et al.*, 1996), interrumpe las preferencias inducidas por la administración de Morfina.

Por otro lado, los resultados del presente experimento son compatibles con los datos obtenidos en el Capítulo II y III de la presente Tesis Doctoral así como en otros experimentos previos (Simón *et al.*, 2007). Utilizando protocolos del Aprendizaje Gustativo o de Condicionamiento hacia un Lugar se ha demostrado que la activación del PBle mediante Estimulación Eléctrica induce aversiones o preferencias a Corto Plazo, tanto de carácter gustativo (Simón *et al.*, 2007) como espaciales (Simón *et al.*, 2007; Hurtado, Tesis Doctoral, 2011; Experimento 4, presente Tesis Doctoral), que serían procesadas a través del Sistema Opiáceo, ya que la administración de Naloxona bloqueaba dichas manifestaciones apetitivas y aversivas.

Finalmente, otros estudios llevados a cabo por este laboratorio apoyan, aunque indirectamente, la relevancia del Sistema Opiáceo en los procesos adquisitivos a Corto Plazo. En efecto, se ha demostrado que el PBle procesa tanto los procesos adquisitivos (Mediavilla *et al.*, 2000; Zafra *et al.*, 2002; Simón *et al.*, 2007; Experimento 3, presente Tesis Doctoral) como los nutritivos (Capítulo III de la presente Tesis Doctoral), pero sólo a Corto Plazo, y, en particular, estaría implicado en la acción anoréxica inducida por los antagonistas opiáceos (Experimento 7, presente Tesis Doctoral).

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio apoyan la hipótesis de que los procesos adquisitivos a Corto Plazo (Concurrente/Implícito) son procesados a través del eje neuroanatómico Vagal-Parabraquial y que éstos, a su vez, implican la participación del Sistema Opiáceo. En ausencia de esta vía de procesamiento de información visceral los animales logran resolver las tareas utilizando otras estrategias, al parecer de índole explícita/relacional.

## **EXPERIMENTO 9: Retención del Aprendizaje Aversivo Gustativo Concurrente tras la administración de Naloxona.**

Como se ha mostrado en el Experimento 8 la administración de Naloxona puede impedir la adquisición Concurrente/Implícita de una tarea de AAvG, presumiblemente al interrumpir el funcionamiento del eje neuroanatómico Vago-PBle que previamente ha sido implicado en los procesos nutricionales (Zafra *et al.*, 2003, 2004; Capítulo III, presente Tesis Doctoral) y adquisitivos (Arnedo y Puerto, 1986; Arnedo *et al.*, 1989, 1990, 1991; Arnedo *et al.*, 1993; Mediavilla *et al.*, 2000; Zafra *et al.*, 2006; Simón *et al.*, 2007; Experimento 4, presente Tesis Doctoral) a Corto Plazo.

Con respecto a la controversia existente sobre la función del Sistema Opiáceo en los procesos adquisitivos y expresivos, hay autores que consideran que el Sistema Opiáceo interviene tanto en la adquisición como en la expresión de las preferencias (por la dieta) (Levine *et al.*, 2002), mientras que otros, por el contrario, no lo relacionan ni con la adquisición ni con la expresión de preferencias (Yu *et al.*, 1999; Azzara *et al.*, 2000; Frisina y Sclafani, 2002; Baker *et al.*, 2004).

Sin embargo, utilizando tareas de Condicionamiento de Preferencia hacia un Lugar (CPL) se ha propuesto que los antagonistas opiáceos inhiben la expresión (pero no la adquisición) de preferencias por Sacarosa (Delameter *et al.*, 2000), así como las preferencias por el lugar asociado con la administración de Morfina (Mucha *et al.*, 1982; Del Pozo *et al.*, 1996; Shippenberg y Elmer, 1998; Manzanedo *et al.*, 2001b).

Existe la posibilidad de que estos resultados contradictorios puedan ser explicados en función de las diferencias procedimentales de las diferentes modalidades de aprendizaje utilizadas (Concurrente y Secuencial), que parecen sustentarse sobre distintos sistemas neurales y funcionales (García *et al.*, 1985; Kiefer, 1985; Arnedo *et al.*, 1990, 1991; Chambers, 1990; Gallo *et al.*, 1992; García, 1990; Agüero *et al.*, 1993a, b; Agüero *et al.*, 1997; Mediavilla *et al.*, 1998, 1999, 2001, 2005). Así, en el Experimento 8 se ha propuesto que el Sistema Opiáceo podría estar implicado en los procesos adquisitivos Concurrentes, pero probablemente no en su retención o almacenamiento.

El sustrato cerebral responsable del aprendizaje no siempre coincide necesariamente con la región donde se almacena la memoria de lo aprendido

(Lalonde y Botez, 1990; Lavond *et al.*, 1993; Bloedel y Bracha, 1995). Así, a través de una tarea de AAvG Concurrente se ha demostrado, por ejemplo, que los núcleos profundos del Cerebelo son esenciales en los procesos adquisitivos pero no en la retención de los mismos (Mediavilla *et al.*, 2000). Resultados similares se han obtenido utilizando otros modelos de aprendizaje tales como el Condicionamiento de Evitación Pasiva (Guillaumin *et al.*, 1991), el Condicionamiento Clásico Parpebral en animales (Bracha *et al.*, 1998; Chen y Steinmetz, 2000) y en humanos (Bracha *et al.*, 1997), el Condicionamiento Operante del Movimiento del Antebrazo (Milak *et al.*, 1997), la Habitación a Largo Plazo de la Respuesta de Orientación (Leaton y Suple, 1991) y el Condicionamiento del Reflejo de Retirada (Marchetti-Gauthier *et al.*, 1990). En estos estudios se sugiere que el Cerebelo sería esencial en la adquisición, pero cuestionan su relevancia en la retención y almacenamiento de las tareas aprendidas. Esta diferenciación anatómica no parece ser exclusiva del Cerebelo. Concretamente, lesiones en el Núcleo Pedúnculo pontino impide el aprendizaje de tareas de Evitación sin afectar a su retención o su memoria (Fujimoto *et al.*, 1990); igualmente, la Amígdala parece esencial en la adquisición del Miedo Condicionado pero no parece ser la región responsable del almacenaje de este aprendizaje (Lavond *et al.*, 1993).

Con el objetivo de examinar la implicación del Sistema Opiáceo en los procesos de recuerdo/expresión del AAvG Concurrente (a C.P./Implícito), se ha llevado a cabo el presente experimento, en el que los animales que habían adquirido previamente esta modalidad de aprendizaje reciben, antes de la prueba de retención, la administración de Naloxona, un antagonista opiáceo.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

### **SUJETOS**

Se utilizaron 28 ratas de la raza Wistar con una media de peso corporal de 321.0 g. al principio del experimento. Durante el procedimiento experimental fueron excluidas 5 animales, 4 al desprendérseles las fístulas intragástricas y otro porque no superó la intervención quirúrgica. Los 23 animales restantes fueron aleatoriamente asignados a dos grupos: 1) un Grupo Naloxona (17 animales), que recibió la administración del Vehículo (agua destilada) durante cada uno de los días del periodo adquisitivo y 2) un Grupo Control (6 animales), al que se le aplicó el mismo procedimiento que al Grupo Naloxona. Sin embargo, en el 6º día (Prueba de Retención), aquellos animales del Grupo Naloxona que consumieron más del 70%

del sabor asociado a Vehículo recibieron la administración de Naloxona, mientras que los animales equivalentes del Grupo Control sólo recibieron la inyección de agua destilada.

## **PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO**

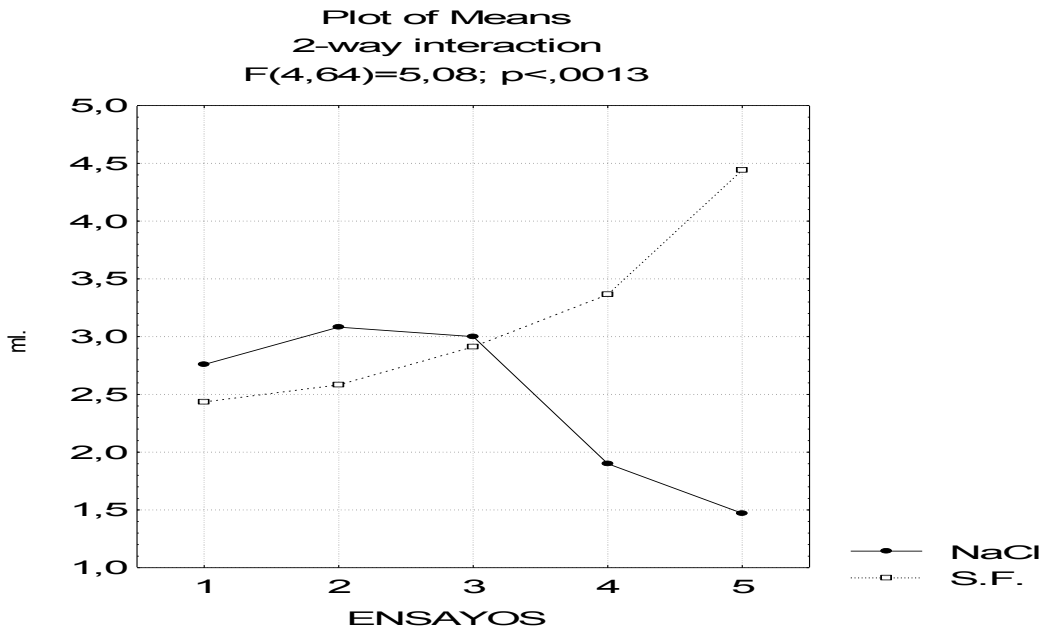
A cada uno de los animales se les implantó 2 fístulas intragástricas de la manera descrita en el Experimento 1 de la presente Tesis Doctoral.

## **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

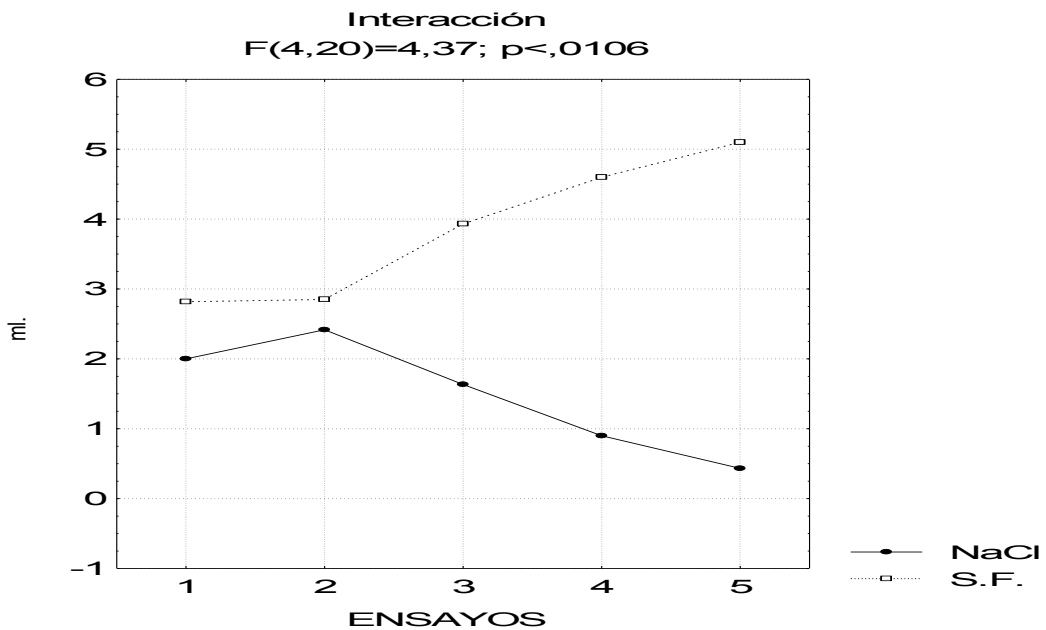
El procedimiento experimental que se utilizó para llevar a cabo el AAG Concurrente es idéntico al descrito en el Experimento 2. La única diferencia añadida estaría relacionada con el hecho de que en el sexto día, una vez que los animales han aprendido la tarea discriminativa, se les administra Naloxona subcutáneamente (4 mg/kg.) y se les ofrece de nuevo los dos sabores en las mismas posiciones del aprendizaje, aunque ahora sin administración intragástrica alguna. De acuerdo con los estudios realizados por este laboratorio (Mediavilla *et al.*, 2000), en esta prueba sólo se han utilizado animales que al haber consumido más del 70% del sabor “correcto” (asociado con la administración de S.F.) confirman que la tarea ha sido aprendida adecuadamente.

## **RESULTADOS**

Los resultados del periodo adquisitivo del AAvG Concurrente (a C.P.), y que incluye a todos los animales del presente experimento, se resumen en la Gráfica 4.4 (Grupo Naloxona) y en la Gráfica 4.5 (Grupo Vehículo):



**Gráfica 4.4:** Media de las cantidades diarias consumidas por todos los animales del Grupo Naloxona del estímulo gusto-olfatorio asociado con NaCl hipertónico y del relacionado con Suero Fisiológico Isotónico durante la tarea del AAvG Concurrente (a C.P.).

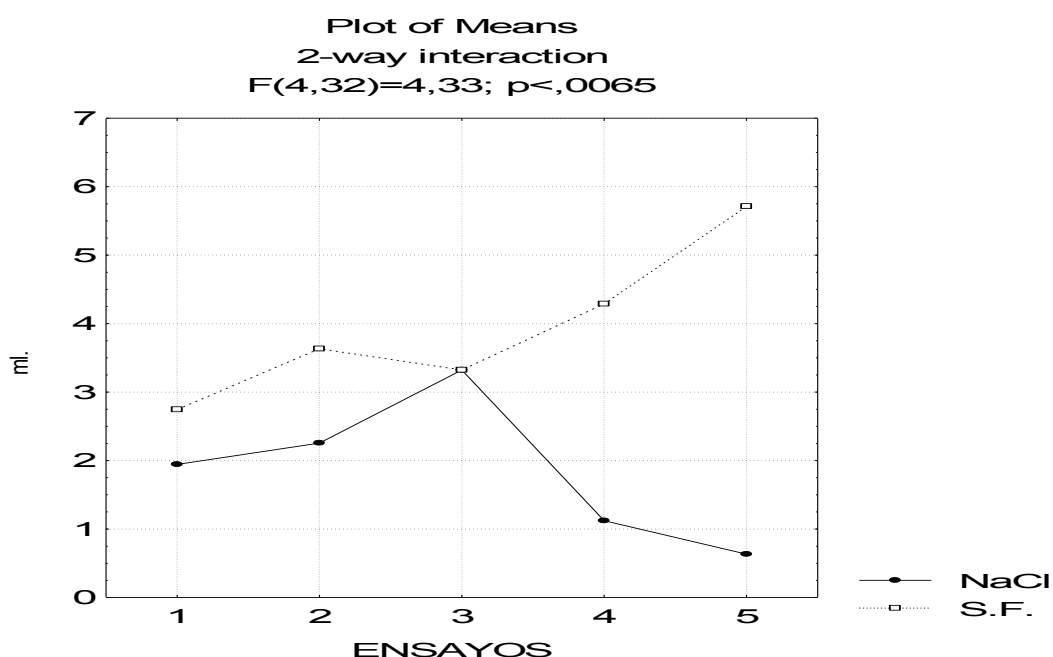


**Gráfica 4.5:** Media de las cantidades diarias consumidas por todos los animales del Grupo Vehículo del estímulo gusto-olfatorio asociado con NaCl hipertónico y del relacionado con Suero Fisiológico Isotónico durante la tarea del AAvG Concurrente (a C.P.).

El ANOVA realizado para examinar el resultado del aprendizaje demuestra que todos los animales, tanto del Grupo Naloxona [ $F(4, 64)= 5.07, p<0.001$ ] como del Grupo Vehículo [ $F(4, 20)= 4.36, p<0.01$ ], aprenden a desarrollar aversión hacia el estímulo gusto-olfatorio asociado con la administración intragástrica simultánea de NaCl hipertónico.

A continuación y con el objetivo de estudiar la retención/expresión de este aprendizaje se eligieron aquellos animales que mostraban una clara preferencia por el estímulo gusto-olfatorio asociado con S.F. (+ del 70%). En este sentido, de los 17 animales del Grupo Naloxona, 9 de ellos consumieron más del 70% del sabor asociado con la administración de S.F. mientras que todos los animales (6) del Grupo Vehículo alcanzaron este criterio.

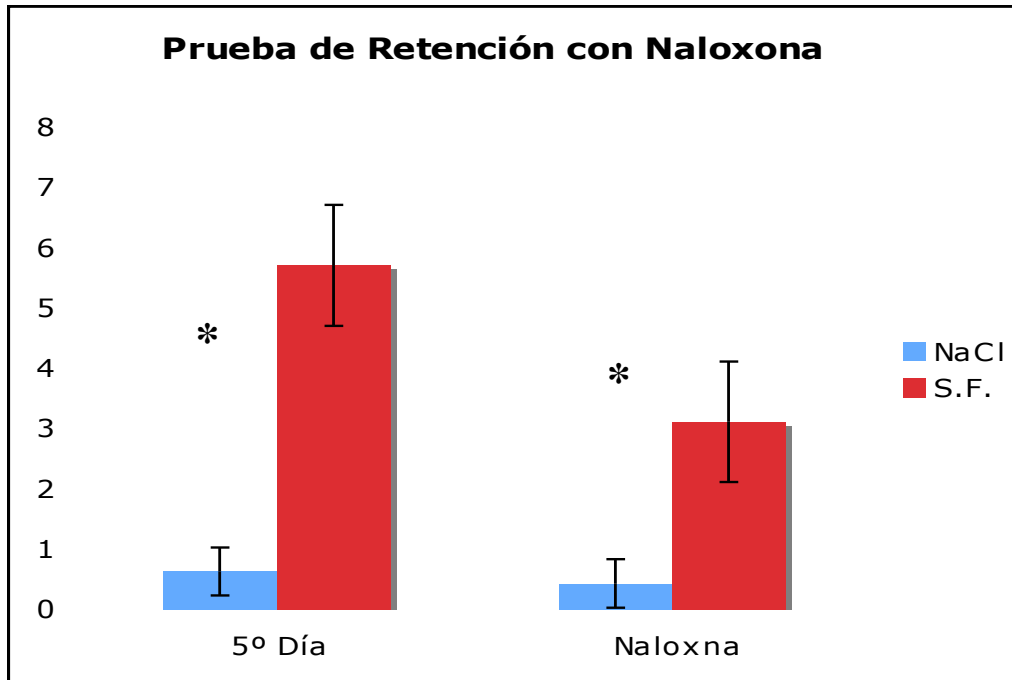
El resultado del periodo adquisitivo (5 días) de los animales del Grupo Naloxona que mostraban preferencia (+70%) por el estímulo gusto-olfatorio asociado con S.F. se resumen en la Gráfica 4.6:



**Gráfica 4.6:** Media de las cantidades diarias consumidas por los animales del Grupo Naloxona (+70%) del estímulo gusto-olfatorio asociado con NaCl hipertónico y con Suero Fisiológico Isotónico.

El ANOVA realizado para determinar el aprendizaje en los animales del Grupo Naloxona que el 5° día prefieren + del 70 % el estímulo gusto-olfatorio asociado con S.F. muestra el desarrollo de aversión hacia el estímulo gusto-olfatorio asociado con la administración intragástrica de NaCl hipertónico [ $F(4, 32)= 4.33, p<0.006$ ].

Con respecto a los resultados de la Prueba de Retención/Expresión de los animales del Grupo Naloxona (+70 %) se resumen en la Gráfica 4.6:

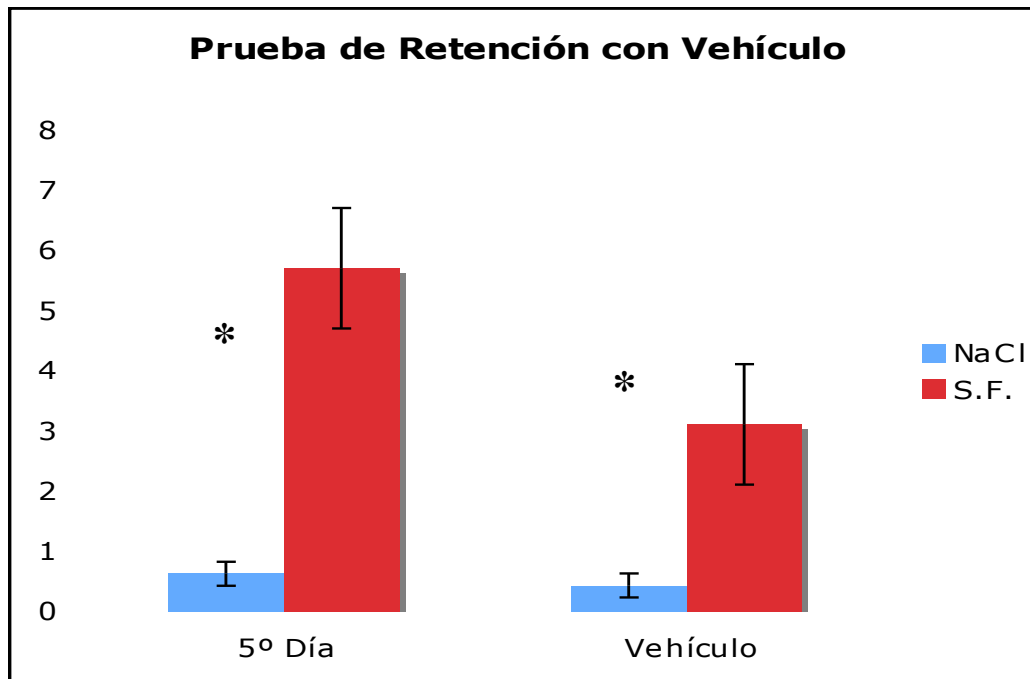


**Gráfica 4.6:** Media de las cantidades ingeridas por los animales del Grupo Naloxona (+70%) del estímulo gusto-olfatorio asociado con NaCl hipertónico y con Suero Fisiológico Isotónico en el 5º día adquisitivo y durante la Prueba de Retención/Expresión del AAvG Concurrente (a C.P.).

Los resultados obtenidos en este experimento fueron analizados usando un ANOVA (NaCl vs. S.F.), reflejando la existencia de diferencias significativas tanto en el 5º día adquisitivo [ $F(1, 8) = 135.75$ ,  $p < 0.001$ ] como en la Prueba de Retención/Expresión con Naloxona [ $F(1, 8) = 26.63$ ,  $p < 0.001$ ]. Esto es, el tratamiento con el antagonista opiáceo no interrumpía el recuerdo de una tarea AAvG Concurrente adquirida previamente.

Por otro lado, se observa de nuevo que la administración subcutánea de Naloxona (4 mg/Kg.) reduce la ingesta al comparar la ingesta total del 5º día adquisitivo y la Prueba de Retención/Expresión [ $F(1, 8) = 97.61$ ,  $p < 0.001$ ].

Por su parte, el Grupo Vehículo muestra diferencias significativas entre los estímulos gusto-olfatorios tanto en el día 5º [ $F(1, 5) = 1272.7$ ,  $p < 0.001$ ] como en la Prueba de Retención/Expresión con Vehículo [ $F(1, 5) = 810.13$ ,  $p < 0.001$ ] (Gráfica 4.7).



**Gráfica 4.7:** Media de las cantidades ingeridas por los animales del Grupo Vehículo de los estímulos gusto-olfatorios asociados con NaCl hipertónico y con Suero Fisiológico Isotónico en el 5º día adquisitivo y durante la Prueba de Retención/Expresión del AAVG Concurrente (a C.P.).

## DISCUSIÓN

En el presente experimento se ha comprobado que la administración de Naloxona, si bien disminuye la ingesta, no impide la retención/expresión del AAVG Concurrente.

Este resultado está en la línea de los datos de experimentos que demuestran que los antagonistas opiáceos no impiden la expresión de la preferencia por un sabor que había sido asociado con Sacarosa (Yu *et al.*, 1999; Azzara *et al.*, 2000; Frisina y Sclafani, 2002; Bakar *et al.*, 2004).

Sin embargo, los estudios que utilizan tareas de Preferencia hacia un Lugar, observan que los antagonismos opiáceos inhibe la expresión de la preferencia por un lugar que había sido asociado tanto con Sacarosa (Delameter *et al.*, 2000) como con Morfina (Mucha *et al.*, 1982; Del Pozo *et al.*, 1996; Shippenberg y Elmer, 1998; Manzanedo *et al.*, 2001b). Estos resultados, también contradictorios con los datos obtenidos en el presente experimento, podrían explicarse en función de las diferencias en el protocolo experimental utilizado en una y otra serie de experimentos.



Así, en la prueba discriminativa utilizada en los estudios anteriores (con Sacarosa y Morfina) no están presentes los reforzadores y los incentivos son no naturales. Además, los animales podrían estar bajo las consecuencias negativas de la Naloxona, que se sabe que puede llegar a ser aversiva *per se* con dosis iguales o mayores de 2 mg/kg. (Mucha, 1982; Mucha *et al.*, 1985). En efecto, la Naloxona puede inducir AAvG (Rodgers *et al.*, 1984), aumenta el umbral de Auto-Estimulación (Kelsey *et al.*, 1984) e induce la supresión tanto de las respuestas operantes para comida (Schulteis *et al.*, 1994) como de la actividad motora (Brady y Holtzman, 1981). Este malestar inducido por el antagonismo opiáceo puede hacer que el animal, aunque recuerde el lugar preferido, no se dirija a él al sentirse mal.

Por su parte, en el procedimiento experimental del AAvG Concurrente utilizado en el presente experimento, aunque el animal pueda sentir malestar por la administración de Naloxona, tiene presente los reforzadores (incentivo natural), tanto el positivo (están privados de agua y se les ofrece el estímulo gusto-olfatorio en forma líquida) como el negativo (puede evitar la consecuencia visceral aversiva), y, en consecuencia, puede necesitar expresar lo aprendido. Es decir, se podría especular que si bien los animales se sienten mal (Naloxona) pueden evitar otro mal (estímulo gusto-olfatorio asociado con NaCl) y en su lugar expresan su preferencia por algo apetitivo (tienen sed y se les ofrece un estímulo gusto-olfatorio que está asociado a Suero Fisiológico) que está presente.

En cualquier caso, este estudio sugiere que el AAvG Concurrente no estaría almacenado en estructuras de naturaleza opiácea (por ejemplo, PBle) una vez que éste ha sido establecido. Existen datos que ofrecen un apoyo indirecto a esta idea, tanto con el AAvG (Mediavilla *et al.*, 2000) como con otros modelos de aprendizaje (Marchetti-Gauthier *et al.*, 1990; Guillaumin *et al.*, 1991; Fujimoto *et al.*, 1990; Milak *et al.*, 1997; Bracha *et al.*, 1997, 1998; Chen y Steinmetz, 2000; ver revisión en Leaton y Suple, 1991; Lavond *et al.*, 1993). Estos estudios confirman que la región anatómica donde se desarrolla el aprendizaje puede no ser necesariamente la misma que la que almacena la memoria (Lalonde y Botez, 1990; Lavond *et al.*, 1993; Bloedel y Bracha, 1995). En otras palabras, existe la posibilidad de que tanto las estructuras cerebrales como el sistema neuroquímico responsable de la adquisición de un aprendizaje pueden no ser los mismos que los implicados en la retención/expresión de lo aprendido.

## EXPERIMENTO 10: Aprendizaje Aversivo Gustativo Secuencial en animales tratados con Naloxona.

El procedimiento característico del AAvG Secuencial (a L.P./Explícito) consiste en la presentación cada día de uno de los dos sabores que, en uno de los casos, van seguidos (con o sin demora) de la administración de un agente nocivo. Entre las características fundamentales de esta modalidad de aprendizaje se destaca el hecho de que puede desarrollarse sin que exista contigüidad temporal inter-estimular (entre el estímulo gusto-olfatorio y el estímulo visceral aversivo), de que se puede adquirir en un solo ensayo (Gallo *et al.*, 1990, 1991; Gallo *et al.*, 1998), a diferencia de los varios ensayos requeridos para adquirir la modalidad Concurrente, y, finalmente, que es flexible y específico sensorialmente.

La adquisición de AAvG demorados utiliza sustancias nocivas o tóxicas que se procesan por la vía humoral (Cai *et al.*, 1994), por lo que las distintas modalidades de Vagotomías no bloquearían la adquisición de AAvG Secuencial. Tampoco cuando es inducido mediante administraciones intravenosas (i.v.) (Coil *et al.*, 1978), intragástricas o intraperitoneales (Kiefer *et al.*, 1980), LiCl (Martin *et al.*, 1978; Arnedo *et al.*, 1991) o con radiaciones que ocasionan malestar visceral (Hunt *et al.*, 1987).

En todos estos casos la interrupción del Nervio Vago no afecta a la adquisición de AAvG Secuencial (Coil *et al.*, 1978; Martin *et al.*, 1978; Kiefer *et al.*, 1980; Hunt *et al.*, 1987; Arnedo *et al.*, 1991). Por lo tanto, este hecho sugiere que el procesamiento aversivo tiene lugar a través de rutas alternativas a la del Nervio Vago. Alternativamente, por ejemplo, lesiones del Área Postrema, un órgano circunsventricular quimio-receptor, bloquean el AAvG a Sulfato de Cobre (Coil *et al.*, 1978, Coil y Norgren, 1981), a LiCl (Ladowsky y Ossenkopp, 1986; Arnedo *et al.*, 1990; Bernstein *et al.*, 1992), a Metilnitrato de Escopolamina (Gallo *et al.*, 1990, 1991) o a la administración de determinadas radiaciones (Rabin y Hunt, 1983). En esta línea, el AAvG Secuencial también puede ser bloqueado tras lesiones del PBL (Agüero *et al.*, 1993a, b), una región conectada y sobre la que proyecta el Área Postrema (Yamamoto *et al.*, 1992; Bernard *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 1993).

Estos datos sugieren que las dos modalidades de AAvG, Concurrente y Secuencial, se sustentan sobre sistemas neurales y funcionales diferentes (García *et al.*, 1985; Kiefer, 1985; Arnedo *et al.*, 1990, 1991; Chambers, 1990; Gallo *et al.*, 1992; García, 1990; Agüero *et al.*, 1993a, b; Agüero *et al.*, 1997; Mediavilla *et al.*, 1998, 1999,

2001, 2005), así como, probablemente también, en sistemas neuroquímicos distintos (Experimento 8 y 9, presente Tesis Doctoral).

En general, los estudios en los que el bloqueo del Sistema Opiáceo no impide ni la adquisición ni la retención/expresión de una preferencia condicionada por la dieta (Yu *et al.*, 1999; Azzara *et al.*, 2000; Frisina y Sclafani, 2002; Baker *et al.*, 2004) son experimentos con características propias del AAvG Secuencial (Mediavilla *et al.*, 2001). De acuerdo con esta observación, cabe la posibilidad de que esta modalidad de aprendizaje no requiera de la participación del Sistema Opiáceo. En otras palabras, cabe la posibilidad de una participación diferencial del sistema neuroquímico en las dos modalidades de aprendizaje (García *et al.*, 1985; Kiefer, 1985; Arnedo *et al.*, 1990, 1991; Chambers, 1990; Gallo *et al.*, 1992; García, 1990; Agüero *et al.*, 1993a, b; Agüero *et al.*, 1997; Mediavilla *et al.*, 1998, 1999, 2001, 2005; Experimento 8 y 9, presente Tesis Doctoral).

De acuerdo con este planteamiento, el presente experimento tiene por objeto comprobar la implicación del Sistema Opiáceo en una tarea de AAvG Secuencial (a L.P./Explícita). El agente intragástrico aversivo es, una vez más, el NaCl hipertónico, que será administrado después del consumo de uno de los dos sabores que se les ofrece a los animales.

La hipótesis que se plantea en el presente experimento sería que, si bien la Naloxona impide la adquisición (Experimento 8, presente Tesis Doctoral) pero no la retención/expresión (Experimento 9, presente Tesis Doctoral) del AAvG Concurrente, el bloqueo opiáceo podría no tener efecto tampoco sobre la adquisición de una tarea de AAvG Secuencial.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

### **SUJETOS**

Se utilizaron 20 ratas Wistar con una media de peso corporal de 298.3 g. al principio del experimento. Estos animales fueron aleatoriamente asignados a dos grupos: 1) un Grupo Naloxona (10 animales), que recibió la administración subcutánea de Naloxona (4 mg/Kg.) a lo largo de los ensayos de adquisición y 2) un Grupo Control (10 animales), al que se le administra subcutáneamente un Vehículo (agua destilada) durante los ensayos de aprendizaje.

Todos los animales fueron mantenidos en las mismas condiciones descritas para el Experimento 8 del presente Capítulo.

## PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

A todos los animales utilizados en la presente serie de experimentos se les implantó 2 catéteres intragástricos de manera idéntica a la descrita en el Experimento 1 de la presente Tesis Doctoral.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El procedimiento experimental del AAG Secuencial llevado a cabo en el presente experimento se basa en los estudios llevados a cabo por distintos laboratorios (Coil *et al.*, 1978; Martin *et al.*, 1978; Kiefer *et al.*, 1980; Coil y Norgren, 1981; Rabin y Hunt, 1983; Ladowsky y Ossenkopp, 1986; Hunt *et al.*, 1987; Arnedo *et al.*, 1990, 1991, 1998; Gallo *et al.*, 1990, 1991; Bernstein *et al.*, 1992; Agüero *et al.*, 1993a, b). En resumen, el procedimiento Secuencial consiste en la presentación cada día de uno u otro de los dos sabores disponibles (Fresa y Coco; McCormick Co. INC. San Francisco. California. USA), uno de los cuales era asociado a la administración intragástrica de NaCl hipertónico (50% de los animales) y el otro con la administración intragástrica de Suero Fisiológico (50% restante de animales). (Tabla 4.1).

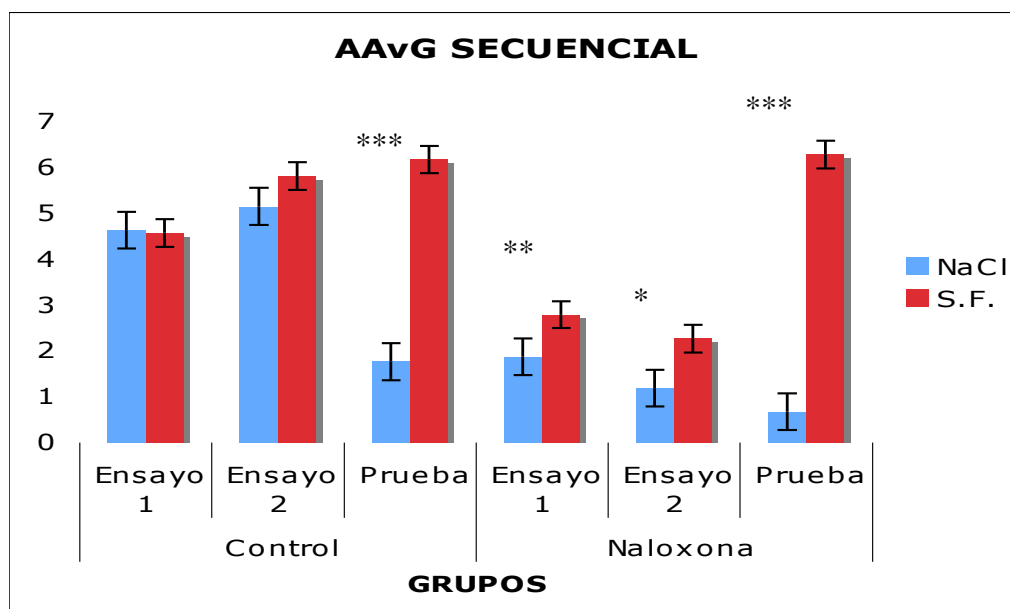
		ENSAYO 1		ENSAYO 2		
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	PRUEBA
ANIMALES	50%	F+NaCl	C+S.F.	F+NaCl	C+S.F.	F Y C
	50%	F+S.F.	C+NaCl	F+S.F.	F+NaCl	F Y C

**Tabla 4.1:** Distribución de los animales y los sabores asociados a los agentes viscerales en un procedimiento de AAVG Secuencial.

En el procedimiento de AAG Secuencial llevado a cabo en el presente experimento se han introducido, sin embargo, algunas modificaciones con respecto a otros estudios realizados previamente por este y otros laboratorios. Así, en el presente experimento la administración i.g. se realizó simultáneamente a la ingesta del sabor a través de una bomba, Mod. A-98 (Razel, USA), que administra la solución a una velocidad constante evitando así los potenciales efectos aversivos de la administración *per se* (Fotografía 1.1). Además, la tasa de administración i.g. de ambos productos (hipertónico e isotónico) es de 0,5 ml/1 ml. de líquido ingerido, es decir, la mitad a la habitualmente utilizada en los experimentos de AAG Concurrente realizados en el Experimento 8 y 9 del presente Capítulo (1 ml/1 ml.). Esta modificación en el protocolo experimental se realizó para solventar la posible crítica teórica de que los animales de la modalidad Secuencial hubiesen aprendido (a diferencia de los animales Concurrentes) al recibir una dosis superior del estímulo nocivo. De hecho, los experimentos previos de AAvG Concurrente llevados a cabo por este mismo laboratorio (por ejemplo, Mediavilla *et al.*, 1998) utilizaban una dosis de 0,5 ml/1 ml. del estímulo gustativo ingerido que fue incrementada a 1 ml/1 ml. para facilitar el aprendizaje de esta tarea (Mediavilla *et al.*, 2000).

## RESULTADOS

Los resultados del presente experimento se resumen en la Gráfica 4.7:



**Gráfica 4.7:** Media de las cantidades ingeridas por el Grupo Control y el Grupo Naloxona del estímulo gusto-olfatorio asociado con NaCl hipertónico y con Suero Fisiológico Isotónico en una tarea de AAVG Secuencial (a L.P.).

El análisis del Grupo Control (Vehículo) muestra que existen diferencias significativas en el efecto Días [ $F(2, 18) = 11.63, p < 0.001$ ], en el efecto Sustancia [ $F(1, 9) = 8.36, p < 0.01$ ], así como en la interacción Días x Sustancia [ $F(2, 18) = 10.82, p < 0.001$ ]. No existen diferencias en la ingesta de los estímulos gusto-olfatorios asociados con NaCl y con Suero Fisiológico en ninguno de los dos ensayos adquisitivos [Ensayo 1:  $F(1, 18) = 0.30, p < 0.86$ ; Ensayo 2:  $F(1, 18) = 1.70, p < 0.20$ ]. Sin embargo, existen diferencias significativas en la prueba de elección [ $F(1, 18) = 15.11, p < 0.001$ ], lo cual demuestra que los animales han aprendido correctamente la Prueba de Discriminación.

Con respecto al Grupo Naloxona los datos obtenidos muestran diferencias significativas tanto en el efecto Días [ $F(2, 18) = 22.89, p < 0.001$ ], como en el efecto Sustancia [ $F(1, 9) = 32.82, p < 0.001$ ], así como en la interacción Días x Sustancia [ $F(2, 18) = 22.07, p < 0.001$ ]. Además, en este grupo existieron diferencias en la ingesta de los estímulos gusto-olfatorios asociados con NaCl y con S.F. tanto en los dos ensayos adquisitivos [Ensayo 1:  $F(1, 18) = 7.21, p < 0.01$ ; Ensayo 2:  $F(1, 18) = 4.56, p < 0.04$ ] como en la Prueba [ $F(1, 18) = 25.02, p < 0.001$ ], lo cual sugiere que la Naloxona no impide el desarrollo de esta modalidad Secuencial del AAvG.

Por otro lado, se reproduce una vez más la acción supresora de la Naloxona sobre la ingesta, ya que se observan diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos con respecto a las cantidades totales ingeridas de los estímulos gusto-olfatorios tanto en el Ensayo 1 [ $F(1, 18) = 25.16, p < 0.001$ ] como en el Ensayo 2 [ $F(1, 18) = 46.26, p < 0.001$ ], sin que existan diferencias en la Prueba [ $F(1, 18) = 1.79, p < 0.19$ ], cuando ninguno de los dos grupos recibe la administración de Naloxona.

## **DISCUSIÓN**

Los resultados del presente experimento demuestran que la administración de Naloxona, aunque disminuye la ingesta, no bloquea la adquisición del AAvG Secuencial.

De nuevo estos datos son compatibles con los estudios que concluyen que el bloqueo opiáceo no impide el desarrollo de preferencias gustativas (Yu *et al.*, 1999; Azzara *et al.*, 2000; Frisina y Sclafani, 2002; Baker *et al.*, 2004). Estos resultados son compatibles parcialmente con los estudios que utilizan tareas de Condicionamiento de Preferencia hacia un Lugar y en los que se observa que la administración de un

antagonista opiáceo, aunque impide la expresión, no bloquea la adquisición (Delameter *et al.*, 2000).

En cualquier caso, todos estos estudios coinciden en el hecho de que utilizan procedimientos experimentales Secuenciales.

En este contexto, resulta relevante mencionar la propuesta ofrecida por el grupo de Bodnar y Sclafani, según la cual el bloqueo opiáceo, aunque reduce la ingesta al disminuir las propiedades hedónicas y/o post-ingestivas (Experimento 7, presente Tesis Doctoral), no inhibe los procesos adquisitivos, sino que, en cierta medida y sorprendentemente, los facilita (Yu *et al.*, 1999; Azzara *et al.*, 2000; Frisina y Sclafani, 2002; Baker *et al.*, 2004). En otras palabras, aunque los animales consumen cantidades mínimas son capaces de aprender la tarea, incluso en un solo ensayo. Así, en el presente experimento el Grupo Naloxona muestra diferencias estadísticamente significativas entre los sabores tanto en el ensayo 1 como en el 2. Esto es, parecería como si el Sistema Opiáceo endógeno natural pudiera estar interfiriendo con la adquisición de ciertos tipos de aprendizajes.

Esta última idea podría resultar relevante a la luz de algunos estudios neuroquímicos que implican al Sistema Opiáceo en distintos procesos cerebrales inhibitorios (Buller *et al.*, 2005). En el contexto de la presente investigación, el hecho de que algunas de las principales estructuras neurales implicadas en la modalidad Secuencial del AAvG, como por ejemplo el Área Postrema, estén ampliamente innervadas por el Sistema Opiáceo (Leslie *et al.*, 1989; Barnes *et al.*, 1991; Bhandari *et al.*, 1992; Guan *et al.*, 1997), permite hipotetizar que el Sistema Opiáceo endógeno pueda estar ejerciendo una acción inhibitoria sobre su potencial discriminativo a Largo Plazo. Concretamente, se ha observado que la activación de estructuras cerebrales tales como el PBle y el AP tras la administración de productos que inducen inmunodepresión (Interleucina-1 $\beta$ ), queda modificada diferencialmente tras la administración conjunta de este producto nocivo con Naloxona (Buller *et al.*, 2005) y así, mientras el subnúcleo PBle disminuye su actividad (en comparación con la administración única del producto nocivo), el AP, por el contrario, aumenta su activación (Buller *et al.*, 2005). Estos datos permiten especular que la Naloxona podría impedir la adquisición del AAvG Concurrente al inhibir la acción del PBle ante estímulos nocivos, núcleo que se sabe está implicado en esta modalidad adquisitiva (Mediavilla *et al.*, 2000; Simón *et al.*, 2007). Por su parte, el antagonismo opiáceo facilitaría la adquisición del AAvG Secuencial al aumentar la actividad del

AP, una estructura que se sabe está implicada en el AAvG Secuencial (Ladowsky y Ossenkopp, 1986; Gallo *et al.*, 1988, 1990, 1991; Bernstein *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1992). Esta interpretación podría ser compatible con los resultados obtenidos por el Grupo Naloxona (pero no por el Control) en los dos ensayos de adquisición del AAvG Secuencial. En estos ensayos los animales del Grupo Naloxona discriminan entre los dos sabores ya desde la primera (también en la segunda) asociación viscerogusto-olfatoria, algo que no ocurre en los animales que sólo recibieron la administración del Vehículo.

Por lo tanto, y resumiendo, la administración de Naloxona no sólo impide la adquisición de la modalidad Secuencial del AAvG (Explícita), sino que la facilita.





## **DISCUSIÓN GENERAL**

El objetivo de la presente Tesis Doctoral ha consistido en analizar la significación funcional del eje anatómico Vagal-Parabraquial-Amigdalino, centrándose en dos estructuras cerebrales localizadas a nivel Tronco-Encefálico una de ellas (Núcleo Parabraquial Lateral Externo; Pble) y a nivel del Prosencéfalo la otra (Núcleo Central de la Amígdala, CeA). Concretamente se ha examinado su relevancia en distintos procesos adquisitivos (Aprendizaje Aversivo Gustativo, AAvG; y Condicionamiento hacia un Lugar, CL) y motivacionales (Nutrición a Corto, C.P.; y a Largo Plazo, L.P.). Estas dos áreas cerebrales que están estrechamente interconectadas anatómicamente entre sí (Bernard *et al.*, 1993), han sido implicadas previamente en el procesamiento de muy distintos procesos adquisitivos y también regulatorios, sobre todo a partir de la rápida información sensorial y visceral, tanto de índole aversiva como apetitiva, que reciben.

Los resultados obtenidos en esta Tesis sugieren que el eje neuroanatómico Vago-Pble-CeA al participar en los diversos procesos adquisitivos (Aprendizaje) y motivacionales (Nutrición a Corto Plazo) lo hace utilizando sistemas y mecanismos de índole Opiácea.

Los resultados del Capítulo I muestran que las lesiones del CeA (en animales con Bulbectomía Olfatoria) impiden la adquisición de una tarea de AAvG Concurrente inducida mediante la administración intragástrica de NaCl hipertónico (estímulo aversivo) y con índices discriminativos de carácter gusto-olfatorios. Este bloqueo ha sido explicado a partir de la interrupción de las sensaciones viscerogusto/olfatorias necesarias para la adquisición de esta tarea.

Los resultados obtenidos en el Experimento 1 con técnicas de *c-fos* se decantan del lado de los estudios que demuestran que el CeA es el subnúcleo amigdalino relevante en el procesamiento de la acción de los productos aversivos administrados intragástricamente (NaCl hipertónico) (Michl *et al.*, 2001 vs. Gu *et al.*, 1993). Esta sustancia hipertónica (aversiva) es la que se utiliza aquí para la inducción del AAvG.

Estudios previos habían demostrado que el NaCl hipertónico induce expresión de *c-fos* en diversas estructuras cerebrales (Gu *et al.*, 1993; Carlson *et al.*, 1997; Carlson *et al.*, 1998; Michl *et al.*, 2001), entre ellas en el CeA (Michl *et al.*, 2001). Sin embargo,

otros autores por el contrario habían concluido que el subnúcleo amigdalino implicado en la acción aversiva del NaCl hipertónico era el Núcleo Basolateral (BLA) (Gu *et al.*, 1993). Esta discrepancia con los restantes estudios permanece sin ser explicada aunque, quizá, la vía de administración intraperitoneal haya podido determinar la participación de rutas no neurales (esto es, el Sistema Circulatorio). Sin embargo, la vía de administración llevada a cabo en el Experimento 1 (intragástrica) no impide el acceso al sistema circulatorio humoral y, por lo tanto, debería de haber activado el BLA, hecho que no se ha producido. La significación de las otras diferencias en el protocolo experimental (Gu *et al.*, 1993), tales como la dosis del NaCl hipertónico (3 ml/Kg vs. 16.66 ml/Kg), la localización neuroanatómica, etc., permanece abierta para futuras investigaciones.

Sin embargo, el resultado obtenido en este estudio es compatible con los datos anatómicos que muestran que las aferencias vagales gastrointestinales, que en un primer momento proyectan hacia el NTS<sub>c</sub> (Contreras *et al.*, 1980; Hyde y Miselis, 1982; Norgren y Smith, 1988) y al PBle (Papay y Ferguson, 1990; Bernard *et al.*, 1993; Halsell y Travers, 1997; De Lacalle y Saper, 2000; Karimnamazi *et al.*, 2002), finalizan posteriormente en el CeA (Bernard *et al.*, 1993; Michl *et al.*, 2001).

La participación específica del CeA en el procesamiento de las propiedades viscer-aversivas del NaCl ha recibido apoyo adicional a través de los estudios que muestran como la administración de una gran variedad de estímulos aversivos y/o estresantes (por ejemplo, LiCl) también activa este subnúcleo del complejo amigdalino (Bernard *et al.*, 1993). También se ha demostrado la activación del CeA tras la administración intragástrica de Ácido Clorhídrico (HCl), el cual induce AAVG (Ervin *et al.*, 1990), que puede ser bloqueado tras la aplicación de Vagotomías (Michl *et al.*, 2001).

Finalmente, en un estudio llevado a cabo por Nakagawa y colaboradores (Nakagawa *et al.*, 2003) se examina particularmente la implicación de los principales subnúcleos amigdalinos en el procesamiento de los estímulos nocivos. Estos autores llegan a la conclusión de que el BLA sería relevante en el procesamiento de los estímulos nocivos somáticos (Formalina administrada en la planta de la pata) mientras que el CeA lo sería para los estímulos nocivos viscerales (en este caso Ácido Acético administrado intraperitonealmente).

Por otra parte, las aferencias gustativas, que en un primer momento proyectan al NTS<sub>r</sub> (Travers y Norgren, 1995; Travers y Hu, 2000) y de éste al PBm (Norgren y

Leonard, 1973; Norgren, 1976; Lundy y Norgren, 2001), terminan también en el CeA (Saper y Lowey, 1980; Cechetto, 1987; Moga *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1992), convirtiendo así a este subnúcleo amigdalino en una de las regiones cerebrales rostrales donde pueden converger tanto la información visceral como la gustativa, necesarias ambas para el desarrollo de las tareas de AAvG Concurrente (Saper y Lowey, 1980; Cechetto, 1987; Moga *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1992). Este subnúcleo, además, está considerado como uno de los componentes neurales implicados en la asignación de significado emocional, o valencia, a eventos a través del aprendizaje asociativo (Hitchcock y Davis, 1991; Yamamoto *et al.*, 1994; Campeau y Davis, 1995; Hatfield y Gallagher, 1995; Martin, 1997; Pitkänen *et al.*, 1997).

En el Experimento 2 se ha comprobado que las lesiones del CeA (que eliminan la convergencia viscerogustativa), junto con la necesaria Bulbectomía Olfatoria (que eliminaría la utilización alternativa de información olfatoria), bloquea la capacidad de los animales para adquirir una tarea de AAvG Concurrente, presumiblemente al haber interrumpido el procesamiento de todos los índices sensoriales relevantes en dicho aprendizaje, según proponía la Hipótesis Neuroanatómica Integrada (García *et al.*, 1968).

Estos resultados obtenidos en el Capítulo I pueden ser relevantes en el contexto de la controversia sobre la implicación de los distintos subnúcleos amigdalinos en el AAvG. Así, mientras que una mayoría de los estudios han destacado el importante deterioro en el AAvG que se produce tras las lesiones del BLA (Nachman y Ashe, 1974; Aggleton *et al.*, 1981; Yamamoto y Fujimoto, 1991; Yamamoto, 1993; Yamamoto *et al.*, 1994; Schafe *et al.*, 1998; Sakai y Yamamoto, 1999; Morris *et al.*, 1999), ahora se añade aquí que las lesiones del CeA pueden bloquear el aprendizaje particularmente en la modalidad Concurrente (a Corto Plazo). Dado que esta modalidad Concurrente del AAvG se sustenta en circuitos neuroanatómicos diferenciales, distintos desde luego a los utilizados en la modalidad Secuencial (a Largo Plazo) (García *et al.*, 1985; Kiefer, 1985; Chambers, 1990; García, 1990; Mediavilla *et al.*, 1998, 1999, 2000, 2001, 2005), podría proponerse que el BLA sea el sustrato responsable para la modalidad Secuencial (la modalidad mayoritariamente utilizada) mientras que el CeA lo sería para la modalidad Concurrente.

Sin embargo, conviene destacar en este contexto la relevancia del componente olfatorio asociado a los sabores, un índice sensorial ignorado habitualmente en la

mayoría de estudios de AAvG pero que en el Experimento 2 ha debido ser interrumpido. Es bien sabido que las principales aferencias de carácter olfatorio proyectan hacia los Núcleos Amigdalinos Centromediales (Núcleo Corticales Anterior, Núcleo Cortical Posterolateral y Núcleo Medial) (Scalia y Winans, 1975; Price, 1990) y que, por lo tanto, la eliminación de la información viscerogustativa producida tras las lesiones del CeA (Saper y Lowey, 1980; Cechetto, 1987; Moga *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1992) mantendría intacta la información olfatoria, la cual podría ser individualmente asociada con el malestar visceral (De Araujo *et al.*, 2003; Capaldi *et al.*, 2004). Así, algunos autores sugieren (Bures *et al.*, 1998; Rollins *et al.*, 2001; Sclafani *et al.*, 2001; Capaldi *et al.*, 2004; Touzani y Sclafani, 2005) que el término AAvG debería ser sustituido en la mayoría de los casos por el de Aprendizaje Aversivo al Sabor (AAvS), entendiendo por “sabor” la suma del componente “gustativo” y “olfatorio” de un estímulo.

En resumen, los resultados del Capítulo I sugieren que las lesiones del CeA (que implica claves viscerogusto-afectivas), necesariamente junto a las Bulbectomías Olfatorias (implicando claves olfatorias), interrumpe la información necesaria para desarrollar una tarea de AAvG Concurrente (a Corto Plazo) cuando se asocian estímulos gusto/olfatorios con las consecuencias aversivas del NaCl hipertónico administrado intragástricamente.

En el Capítulo II se demuestra que la activación mediante Estimulación Eléctrica Intracerebral, tanto del CeA como del PBL (Experimentos 3 y 4, respectivamente) induce consistentemente tres tipos de comportamientos en tareas de Condicionamiento hacia un Lugar (CP): 1) un número variable de animales manifiestan una aversión hacia el lugar asociado con la Estimulación Eléctrica Intracerebral del CeA o del PBL (Condicionamiento Aversivo hacia un Lugar; CAL); 2) otros, por su parte, manifiestan repetidamente preferencias por los estímulos del entorno asociados con la activación de estas estructuras (Condicionamiento de Preferencia hacia un Lugar; CPL); y 3) finalmente, se forma un tercer grupo de animales (“neutrales”) que no muestra una consistente preferencia o aversión hacia los distintos estímulos del entorno asociados a la estimulación. Este resultado hace suponer que ambos núcleos cerebrales podrían formar parte de un circuito neural implicado tanto en los procesos aversivos como de recompensa cerebral. Sin embargo, se ha demostrado que a diferencia de los efectos reforzantes inducidos por

la Estimulación Eléctrica del PBle que serían procesados por el Sistema Opiáceo (la administración de Naloxona bloquea los efectos recompensantes) la activación reforzante del CeA se mantiene tras la administración de Naloxona, lo cual sugiere que distintos sistemas neuroquímicos, uno Opiáceo y el otro por determinar, procesarían los efectos recompensantes de este eje anatómico reforzante.

Con respecto a las propiedades aversivas/reforzantes de la Estimulación Eléctrica del PBle existen datos que demuestran la presencia (abundante) de receptores opiáceos en esta estructura (Mansour *et al.*, 1995a, b). Más aún, la estimulación química diferencial de los receptores  $\mu$  y  $\kappa$  del Complejo Parabraquial Lateral (que incluía previsiblemente al PBle) puede generar preferencias o aversiones, dependiendo de los sistemas opiáceos activados (Moufid-Bellancourt *et al.*, 1996).

Estos datos son compatibles con la idea de que una misma estructura cerebral podría estar implicada tanto en los procesos motivacionales negativos como positivos (Salamone, 1994; Yamamoto *et al.*, 1994; Reynolds y Berridge, 2002; Simón *et al.*, 2007). También el Sistema Opiáceo puede inducir efectos opuestos, a través de los receptores  $\kappa$  y  $\delta$  sobre la acción del Sistema Dopaminérgico Mesocorticolímbico (Spanagel *et al.*, 1992). Sin embargo, los receptores  $\mu$  parecen mediar tanto las propiedades aversivas como las apetitivas de la morfina (Matthes *et al.*, 1996), mientras que en su caso la Naloxona parece ejercer sus efectos aversivos actuando principalmente sobre este subtipo específico de receptor opiáceo (Skoubis *et al.*, 2001). Todo esto hace que, de momento, no pueda determinarse si los efectos aversivos/apetitivos de la Estimulación Eléctrica del PBle podrían ser procesados a través de los mismos o distintos receptores opiáceos.

Por otra parte, los resultados del Experimento 3 descartan la implicación directa del Sistema Opiáceo en los efectos aversivos/recompensantes de la Estimulación Eléctrica del CeA, lo cual permite suponer que la activación reforzante del CeA debe ser procesada a través de un sistema neuroquímico no determinado, pero probablemente distinto del Opiáceo.

Los datos obtenidos en relación con las propiedades aversivas de la Estimulación Eléctrica del PBle son compatibles con otros resultados obtenidos previamente en este y otros laboratorios. Así, lesiones específicas del PBle (Mediavilla *et al.*, 2000) o del PBl en general (Bechara *et al.*, 1993; Nader *et al.*, 1996) bloquean el AAvG asociado con la administración de NaCl hipertónico o de Morfina, respectivamente.

Más aún, la Estimulación Eléctrica del Área Postrema, utilizada como agente aversivo para inducir AAvG (Gallo *et al.*, 1988; Agüero *et al.*, 1993a), pierde dicha capacidad inductora tras lesiones amplias del Complejo Parabraquial lateral (que al parecer incluye el PBle) (Agüero *et al.*, 1993a).

En esta línea, existen estudios que demuestran la activación del PBle (conjuntamente con otros núcleos cerebrales) tras la administración de productos nocivos tales como, por ejemplo, el NaCl hipertónico (Kobashi *et al.*, 1993) o el LiCl (Gu *et al.*, 1993; Swank y Bernstein, 1994; Yamamoto *et al.*, 1992).

Por otro lado, los datos de carácter recompensante obtenidos tras la Estimulación Eléctrica del PBle también son compatibles con estudios inmunohistoquímicos que han observado la activación del PBle (entre otros muchos núcleos cerebrales) tras la administración de sustancias nutritivas (por ejemplo, Glucosa) (Sakai y Yamamoto, 1997; Wang *et al.*, 1999; Yamamoto y Sawa, 2000a) o de sustancias simplemente apetitivas (por ejemplo, Sacarina) (Yamamoto *et al.*, 1994; Yamamoto y Sawa, 2000b), así como tras la administración de algunas drogas de abuso (por ejemplo, cocaína, morfina y anfetaminas) (Sakai y Yamamoto, 1997; Yamamoto y Sawa, 2000a, 2000b; Grabus *et al.*, 2004). Por el contrario, tanto las lesiones del Área Parabraquial en general (incluyendo el PBle) como las lesiones específicas del PBle interrumpen la preferencia por los alimentos apetitivos (Edwards y Ritter, 1989) o por estímulos gustativos asociados con la administración intragástrica de nutrientes reforzantes (Zafra *et al.*, 2002).

Esta implicación del PBle en los procesos recompensantes podría estar relacionada con una reducción en el estado de necesidad y/o con una modificación específica en el valor hedónico de los estímulos gustativos (Le Magnen, 1992; Berridge, 2003). De hecho, es bien sabido que el PBle constituye uno de los principales relevos centrales en el procesamiento de los estímulos viscerales y gustativos (Fulwiler y Saper, 1984; Bernard *et al.*, 1993; Halsell y Travers, 1997; De Lacalle y Saper, 2000; Karimnamazi *et al.*, 2002). Con respecto a esta última posibilidad, la Estimulación Eléctrica del PBle podría haber actuado como sustituto adecuado de los estímulos viscerales y/o las consecuencias de sus efectos motivacionales reforzantes (Cubero y Puerto, 2000b) y para lo cual el PBle está estratégicamente localizado en relación a la recepción de información periférica relacionada con la ingesta (Calingasan y Ritter, 1993; Ritter *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1999; Yamamoto y Sawa, 2000a, 2000b).

La Estimulación Eléctrica del PBle ha podido generar preferencias por los estímulos asociados de manera similar a como los inducen los efectos recompensantes rápidos inducidos por la administración intragástrica de algunas sustancias nutritivas (Puerto *et al.*, 1976). En este sentido, la Estimulación Eléctrica del componente aferente del Nervio Vago induce *c-fos* en el PBle, entre otros núcleos (Gieroba y Blessing, 1994; Saleh y Cechetto, 1993). También, se ha demostrado que la presencia de nutrientes en el intestino, combinado con procesos de liberación hormonal (por ejemplo, Colicistoquinina, CCK), genera señales que son procesadas también por la vía Vagal-PBle (Li y Rowland, 1995).

Estos resultados, tal y como sugieren algunos autores, ofrecen la posibilidad de que las diferentes modalidades reforzantes (homeostasis, sustancias de abuso, estimulación eléctrica, etc.) podrían estar relacionadas y coincidir neurobiológicamente en alguno de los sistemas anatómicos del refuerzo cerebral (Berman *et al.*, 1994; Wolinsky *et al.*, 1996; Fernández-Espejo, 2002; Kelley y Berridge, 2002).

Por su parte, las propiedades aversivas de la Estimulación Eléctrica del CeA pueden estar en consonancia con los estudios que consideran a la Amígdala como uno de los sustratos neurales implicados en el procesamiento aversivo y al CeA, concretamente, como el núcleo cerebral crítico para asociar la información aversiva con la emoción negativa que genera (Nakagawa *et al.*, 2005). De hecho, las lesiones del CeA impiden la asociación gusto-viscero-aversiva en un modelo de Aprendizaje Interoceptivo Aversivo (Experimento 2) y además atenúa el Condicionamiento Aversivo hacia un Lugar (CAL) inducido por la retirada (abstinencia) de morfina (Kelsey y Arnold, 1994; Watanabe *et al.*, 2002b; Nakagawa *et al.*, 2005).

Con respecto a las propiedades reforzantes observadas tras la Estimulación Eléctrica del CeA, los resultados obtenidos son compatibles con otras investigaciones que han puesto de manifiesto la implicación de la Amígdala (Everitt *et al.*, 2003; Waraczynski, 2003) y, concretamente, del CeA (Zhu y Pan, 2004, 2005) en estas manifestaciones motivacionales recompensantes. De hecho, algunos autores consideran al subnúcleo central amigdalino (CeA) como un sustrato neural esencial en el aprendizaje de reforzamiento condicionado (Zhu y Pan, 2004, 2005).

También se ha demostrado que algunos de los subnúcleos amigdalinos, incluido el CeA, pueden sustentar la Auto-Estimulación Eléctrica recompensante (Kane *et al.*, 1991; Panagis *et al.*, 1995; Touzani y Velley, 1998). De hecho, diversos estudios con *c-*



*fos* han mostrado que la Estimulación Eléctrica de las principales zonas cerebrales de refuerzo (por ejemplo, Hipotálamo Lateral) está asociada a incrementos en la actividad celular de algunos subnúcleos amigdalinos, entre ellos, el CeA (Arvanitogiannis *et al.*, 1996; Hunt y McGregor, 1998; Touzani y Velley, 1998; Nakahara *et al.*, 1999).

Sin embargo, la ausencia de efecto de la Naloxona sobre las aversiones y preferencias inducidas tras la Estimulación Eléctrica del CeA descarta inicialmente una implicación, al menos directa, del Sistema Opiáceo en los procesos mediados por este subnúcleo amigdalino. Así, mientras en el PBle existe una alta densidad de receptores opiáceos (Atweh y Kuhar, 1977; Lynch *et al.*, 1985; Sales *et al.*, 1985; Mansour *et al.*, 1995a, b; Ding *et al.*, 1996; Chamberlin *et al.*, 1999), no ocurre lo mismo en el caso del CeA (Paden *et al.*, 1987; Mansour *et al.*, 1995a, b; Ding *et al.*, 1996). Existen estudios que demuestran que, por el contrario, la activación del CeA, tras la administración Naloxona (Higgins y Sellers, 1994; Gestreau *et al.*, 2000; Gracy *et al.*, 2001; Nakagawa *et al.*, 2003; Nakagawa *et al.*, 2005), podría ser debida más bien al bloqueo del control tónico inhibitorio opiáceo ejercido sobre el CeA por otra estructura que sí disponen de estos receptores (Le Guen *et al.*, 2001, 2003). El hecho de que la Naloxona no afecte a los efectos inducidos por la Estimulación Eléctrica del CeA y sin embargo bloquee las inducidas por la Estimulación del PBle, podría estar en consonancia con el anteriormente propuesto control inhibitorio opiáceo que presumiblemente ejercería el PBle sobre el CeA (Le Guen *et al.*, 2001, 2003). Así, existen estudios que demuestran la activación del CeA tras la administración de Naloxona (Gracy *et al.*, 2001) y también que micro-inyecciones de este antagonista, directamente en el CeA, induce Condicionamiento Aversivo hacia un Lugar (Stinus *et al.*, 1990; Gracy *et al.*, 2001).

Dado que el CeA está altamente inervado por el Sistema Dopaminérgico (Bouthenet *et al.*, 1991; Lévesque *et al.*, 1992; Scibilia *et al.*, 1992; Shippenberg *et al.*, 1993; Murray *et al.*, 1994; Díaz *et al.*, 1995, 2000; Rezayof *et al.*, 2002) y que ha sido relacionado con los efectos recompensantes de dicho sistema neuroquímico (Arvanitogiannis *et al.*, 1996; Hunt y McGregor, 1998; Touzani y Velley, 1998; Nakahara *et al.*, 1999; Hasue y Shammah-Lagnado, 2002; Baxter y Murray, 2002; Phillips *et al.*, 2003), existe la posibilidad de que los efectos apetitivos hacia los estímulos del entorno inducidos mediante la Estimulación Eléctrica del CeA puedan implicar a este Sistema Dopaminérgico, aunque esta posibilidad teórica está por demostrar.

Sin embargo, esta hipótesis sería compatible con los resultados de estudios en los que se ha demostrado que los efectos recompensantes hacia un entorno inducidos mediante Sacarosa (Agmo *et al.*, 1995) o Morfina (Rezayof *et al.*, 2002) eran bloqueados a través de antagonistas dopaminérgicos.

En resumen, tanto el procesamiento de los estímulos nocivos como de los reforzadores naturales, de las sustancias de abuso y de la Estimulación Eléctrica Intracerebral podrían compartir, al menos en parte, un sustrato común (White y Milner, 1992; Koob, 1992, 1999, 2000; Wise, 1996; Nader y Van der Kooy, 1994; Koob y Le Moal, 2001; Simón, Tesis Doctoral, 2003), en el cual el PBL y el CeA pueden ser dos de los componentes neuroanatómicos del sistema.

Parece probable que el cerebro haya evolucionado para dar respuestas selectivas a estímulos naturales relevantes para la supervivencia y la reproducción, como la comida, la bebida o el sexo. En este proceso evolutivo han aparecido sistemas de refuerzo, especialmente la Vía Mesocorticolímbica, especializados en la formación de hábitos de conducta (Kelley y Berridge, 2002, Fernández-Espejo, 2002). Las drogas de abuso podrían actuar sobre estos sistemas de alguna forma, no necesariamente excluyentes; bien activando estos mecanismos, con intensidad análoga a los reforzadores naturales; bien sensibilizando, distorsionando o modificando unos sistemas cerebrales implicados en el proceso de motivación de incentivo y refuerzo (Di Chiara, 1998; Robbins y Everitt, 1999; Berke y Hyman, 2000; Robinson y Berridge, 2003; Hyman y Malenka, 2001). Las sustancias adictivas podrían modificar drásticamente los circuitos cerebrales del refuerzo implicándolos en estados aversivos (por ejemplo, Síndrome de Retirada) que ejercerían una acción oponente a la de los mecanismos implicados en el procesamiento de los aspectos reforzantes (Kreek y Koob, 1998; Koob y Le Moal, 2001). En otras palabras, las sustancias de abuso podrían usurpar y modificar los procesos motivacionales y conductuales normales que están a la base de los reforzadores naturales.

Igualmente, la Estimulación Eléctrica Intracerebral de ambos núcleos también podría haber activado artificialmente circuitos neurales comunes especializados en la formación de hábitos de conducta, usurpando y activando así los procesos motivacionales y conductuales normales (Di Chiara, 1998; Kreek y Koob, 1998; Robbins y Everitt, 1999; Koob y Le Moal, 2001; Kelley y Berridge, 2002; Fernández-Espejo, 2002; Robinson y Berridge, 2003).

Sin embargo, algunas investigaciones apuntan en dirección opuesta. Se trata de

estudios que demuestran que las neuronas del Núcleo Accumbens, concretamente, exhiben patrones distintos de actividad ante reforzadores naturales (agua y comida) y cocaína (Carelli *et al.*, 2000). También se considera que el aprendizaje inducido en tareas de Condicionamiento hacia un Lugar tiene consecuencias comportamentales diferentes según se utilicen sustancias de abuso o reforzadores naturales. En el primer caso, por ejemplo, los animales permanecen la mayor parte del tiempo en el compartimento reforzado, en contacto con las claves ambientales que han sido asociadas al efecto de la infusión de la droga, mientras que en el segundo caso el condicionamiento es más complejo y, aunque los animales pasan igualmente mucho tiempo en el compartimento reforzado, exhiben mayor número de conductas exploratorias o de búsqueda (Spiteri *et al.*, 2000).

Las observaciones sobre los animales estimulados eléctricamente en el PBle y CeA no permiten dilucidar, por el momento, si sus comportamientos se parecen más al descrito por Spiteri y asociados con respecto al caso de la utilización de drogas de abuso o comida. La Estimulación Eléctrica puede generar preferencias tanto hacia un lugar como también hacia estímulos gusto-olfativos (Simón *et al.*, 2007) mientras que, al revés, las lesiones del PBle interrumpen el efecto reforzante de la administración de nutrientes recompensantes (Zafra *et al.*, 2002). Así, inicialmente sólo se puede establecer que la Estimulación Eléctrica parece estar actuando sobre algún mecanismo general de refuerzo, en consonancia con las propuestas de la mayoría de autores (Di Chiara, 1998; Kreek y Koob, 1998; Robbins y Everitt, 1999; Koob y Le Moal, 2001; Kelley y Berridge, 2002; Fernández-Espejo, 2002; Robinson y Berridge, 2003).

No obstante, no puede descartarse tampoco la idea de que la Estimulación Eléctrica del CeA y del PBle esté activando células gustativas (Yamamoto *et al.*, 1994) y que sean las consecuencias motivacionales de éstas las que queden asociadas a las claves del entorno.

En resumen, los datos del Capítulo II demuestran que la activación inducida mediante Estimulación Eléctrica del CeA o del PBle genera aversiones y preferencias por los estímulos del entorno con los que se asocia. Sin embargo, los sistemas neuroquímicos implicados en estos dos sustratos neurales de recompensa parecen ser distintos, probablemente Opiáceo en el caso de la activación del PBle mientras que están por determinar los mecanismos en el efecto reforzante inducido desde el CeA. Esta disociación sugiere la existencia de, al menos, dos sistemas neuroquímicos

diferentes de recompensa cerebral.

Los resultados obtenidos en el Capítulo III de la presente Tesis indican que el eje neuroanatómico Vagal-PBle-CeA es relevante en los procesos nutritivos a Corto Plazo. Las lesiones individuales de cada uno de sus componentes inducen comportamientos hiperfágicos a Corto Plazo, presumiblemente al interrumpir la información sensorial-vagal necesaria para el proceso de Saciación. Concretamente, en el Experimento 5 se ha observado hiperfagia tanto tras las Vagotomías como tras las lesiones del PBle. Más aún, en el Experimento 6 se demuestra que, aunque los animales lesionados en el PBle ingieren cantidades equivalentes a sus controles de una Comida Líquida, dichas lesiones bloquean el mecanismo compensatorio de re-ingesta que se produce después de la extracción (retirada) parcial de contenidos gástricos en animales previamente alimentados con dicho alimento, un fenómeno muy relacionado con los procesos nutritivos a Corto Plazo (Snowdon, 1970; Davis y Campbell, 1973; Deutsch *et al.*, 1978; Wirth y McHugh, 1983; Kaplan *et al.*, 1994). Por su parte, en el Experimento 7, además de reproducir los datos de hiperfagia inducidos por las lesiones del PBle, se comprueba que la acción anoréxica de los antagonistas opiáceos (mediante la administración subcutánea de Naloxona) parece ser procesada (en parte) a través del PBle, ya que sus lesiones reducen su efecto supresivo sobre la ingesta. Más aún, en este mismo experimento se observan comportamientos hiperfágicos a Corto Plazo inducidos ahora por las lesiones del CeA (específicamente, del Núcleo Central Lateral de la Amígdala, CeL).

Estos resultados son compatibles con numerosas investigaciones que han demostrado que la vía neural Vagal-PBle-CeL podría ser la responsable de procesar el estado viscerosensorial (rápido) del organismo (Bernard *et al.*, 1993; Bourgeais *et al.*, 2001). En este sentido, se ha demostrado la especial relevancia del Nervio Vago en la ingesta de alimentos a Corto Plazo (Snowdon y Epstein, 1970; Mordes *et al.*, 1979; González y Deutsch, 1981; Davis *et al.*, 1994; Phillips y Powley, 1998; Furness *et al.*, 2001; Date *et al.*, 2002; Zafra *et al.*, 2003, 2004).

En este ámbito, la implicación del Nervio Vago en los procesos de Saciación ha sido estudiada casi siempre a través del análisis de la ingesta de comida en animales vagotomizados (Snowdon, 1970; Mordes *et al.*, 1979; González y Deutsch, 1981; Smith *et al.*, 1981; Kral, 1983; Sclafani y Kramer, 1983; Furness *et al.*, 2001; Date *et al.*, 2002; Zafra *et al.*, 2003, 2004, 2006), unas veces ya recuperados de la intervención

quirúrgica (Chavez *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 1999) o también inmediatamente después de la cirugía vagal, lo cual evita la inclusión de factores de aprendizaje que pueden enmascarar el efecto (Phillips y Powley, 1998; Zafra *et al.*, 2003, 2004).

Estas diferencias procedimentales, además de la utilización de dietas diferentes, pueden explicar las discrepancias observadas sobre la ingesta de comida y la posible función del Nervio Vago (Kelly *et al.*, 1999). Así, mientras en el último de los casos la desaferentización vagal genera un sobre-consumo de alimento (South y Ritter, 1983; Castonguay y Bellinger, 1987; Reidelberger y O'Rourke, 1989; Chavez *et al.*, 1997; Curtis y Stricker, 1997; Phillips y Powley, 1998; Kelly *et al.*, 1999; Zafra *et al.*, 2003, 2004), en otros casos (experiencia previa) las Vagotomías no afectan a la ingesta (Lorenz, 1983; Kraly *et al.*, 1986; Castonguay y Bellinger, 1997; Chavez *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 1999; Zafra *et al.*, 2003, 2004).

En los estudios llevados a cabo en este laboratorio (Zafra *et al.*, 2003, 2004) al igual que los resultados publicados con Vagotomías subdiafragmáticas totales (Phillips y Powley, 1998) se observa que los animales vagotomizados completamente ingerían una mayor cantidad de comida que sus controles durante el primer día después de la operación, reduciéndose dichas diferencias en los siguientes días (Snowdon, 1970; Snowdon y Epstein, 1970; Mordes *et al.*, 1979; Louis-Sylvestre, 1983; Davis *et al.*, 1994).

En efecto, el hecho de que en los días posteriores (48, 72 y 96 h. post-quirúrgicas) la ingesta de comida mostrada por los animales capsaicinados del Experimento 5 fuese similar que la de sus controles, hace suponer que otros factores distintos a las aferencias vagales afectadas por la Capsaicina pueden estar implicados en la regulación nutritiva de los animales (Saciudad Condicionada o mecanismos redundantes de Retroalimentación Negativa), compensando así los efectos de las lesiones y contrarrestando las deficiencias producidas por la destrucción de las fibras (Chavez *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 1999, 2000 Zafra *et al.*, 2003).

Con respecto a los efectos hiperfágicos observados en el Experimento 5 tras las lesiones del PBlé existen datos obtenidos por este laboratorio (Zafra *et al.*, 2005) y otros (Takaki *et al.*, 1990) en los que se demuestra un aumento de la ingesta de alimentos tras las lesiones globales del PBl (que incluyen previsiblemente al PBlé). Sin embargo, ahora se demuestra que lesiones específicas de uno solo de los subnúcleos (el Parabraquial Lateral Externo) puede reproducir el efecto total descrito, permitiendo precisar así el sustrato parabraquial implicado en el proceso de nutritivos

a Corto Plazo.

En esta línea existen investigaciones que demuestran que lesiones del PBl, que previsiblemente incluyen posiblemente al PBle (en proceso de investigación actualmente), también pueden inducir un efecto hiperdípico (Ohman y Johnson, 1986; Edwards y Johnson, 1991; Sakai y Yamamoto, 1998; De Gobbi *et al.*, 2001; De Gobbi *et al.*, 2009).

Sin embargo, el hecho de que, con respecto a sus controles, los animales capsaicinados muestren diferencias en la ingesta de Comida Sólida a las 24 h. post-quirúrgicas (hiperfagia) y no existan dichas diferencias en los animales con lesiones del PBle, sugiere que las lesiones del PBle no afectan específicamente al proceso de Saciación y que otros mecanismos alternativos podrían ser responsables de dicho proceso. Entre otros, los siguientes: 1) vías sensoriales, vagales y no vagales (por ejemplo, nervios espinales viscerales del sistema simpático) que proyecten hacia otras estructuras cerebrales distinta al PBle; y 2) un proceso de Saciedad Condicionada, de modo que la experiencia previa adquirida al haber ingerido el alimento permite al animal anticipar, a través de un proceso asociativo, el valor nutritivo de la comida (Treit y Spetch, 1986). Entre estos mecanismos alternativos parece descartarse la implicación de los procesos de absorción (vía humoral) ya que, si así fuese, los animales con lesiones del PBle del no deberían haber mostrado el efecto hiperfágico observado en las pruebas de ingesta de Comida Líquida y Sólida a los 60 y 90 min., respectivamente, tiempo suficiente para poner en marcha los procesos de absorción y la consiguiente activación de estructuras cerebrales implicadas en dicho proceso de Saciación.

En cualquier caso, debe considerarse el hecho de que las lesiones del PBl disminuyen la conducta de neofobia que se produce en presencia de sustancias novedosas (Yamamoto *et al.*, 1995; Grigson *et al.*, 1998a, b; Sakai y Yamamoto, 1998). Este comportamiento adaptativo innato, que se define como la tendencia a evitar sustancias con las que no se ha tenido una experiencia previa (Reilly y Bornovalova, 2005), implica una importante precaución a la hora de interpretar los casos de hiperfagia inducidos por lesiones del PBl y con alimentos con las cuales los animales no han tenido contacto previo.

Sin embargo, en apoyo de los resultados obtenidos ahora, los estudios anatómicos disponibles indican que el PBle es un importante relevo de información viscero-sensorial y nociceptiva vagal (Bernard *et al.*, 1993) y que, por tanto, el efecto

hiperfágico observado tras las lesiones del PBle pudiera deberse, presumiblemente, a una interrupción de alguno/s de los componentes asociados a los procesos de Saciación mediados por el Nervio Vago.

Los datos del Experimento 6 confirman la implicación del eje Vagal-PBle en los procesos nutritivos a Corto Plazo, ya que lesiones del PBle interrumpen el mecanismo compensatorio de re-ingesta a Corto Plazo tras la extracción de contenidos gástricos, un fenómeno ampliamente estudiado en la bibliografía (Snowdon, 1970; Davis y Campbell, 1973; Deutsch *et al.*, 1978; Wirth y McHugh, 1983; Kaplan *et al.*, 1994).

Se ha propuesto que este proceso regulatorio, tan preciso, se produce a través de los mecanismos de Retroalimentación Negativa periférica (Davis y Campbell, 1973; Deutsch *et al.*, 1978; Grill y Norgren, 1978; Kraly y Smith, 1978; Wirth y McHugh, 1983; Grill y Kaplan, 1992), aunque existen discrepancias con respecto a los niveles del sistema gastrointestinal implicados en dicho proceso.

La información visceral procedente de la cavidad gástrica parece ser necesaria y suficiente para regular los procesos de alimentación a Corto Plazo (Davis y Campbell, 1973; Deutsch *et al.*, 1978; Kraly y Smith, 1978; Wirth y McHugh, 1983) y, particularmente, los índices sensoriales originados por la distensión gástrica (Davis y Campbell, 1973; Kraly y Smith, 1978; Wirth y McHugh, 1983). Esta idea ha recibido importantes apoyos utilizando muy diversas técnicas experimentales (Davis y Campbell, 1973; Deutsch *et al.*, 1978; Kraly y Smith, 1978; Wirth y McHugh, 1983; Kaplan *et al.*, 1994).

Alternativamente, otros autores (McHugh y Moran, 1978; Gibbs *et al.*, 1981) destacan los efectos post-gástricos al comprobar cómo las infusiones intraduodenales de nutrientes o algunas de las hormonas intestinales reducen la posterior ingesta de alimentos. Sin embargo, no puede descartarse que muchas de estas manipulaciones post-gástricas reducen la ingesta más por su carácter afisiológico, causante de malestar para el animal, que por su acción estrictamente nutritiva (Deutsch, 1983; Wirth y McHugh, 1983).

Finalmente, el grupo de Kaplan propone que los mecanismos responsables de la Saciación a Corto Plazo podrían implicar señales tanto de origen gástrico como post-gástrico. Esta propuesta se basa en el hecho de que, durante la ingesta, los alimentos pasan por un vaciado gástrico natural que podrían originar simultáneamente señales

post-gástricas (Kaplan *et al.*, 1992) y que, junto con las señales gástricas, desencadenarían el proceso regulatorio de Saciación a Corto Plazo (Wirth y McHugh, 1983; Kaplan *et al.*, 1994).

Sin embargo, en el Experimento 6 se priman los factores de distensión gástrica en los procesos de Saciación ya que la extracción intragástrica se lleva a cabo inmediatamente después de la Saciación (en el experimento del grupo de Kaplan la extracción del contenido gástrico ocurre 10 minutos después de la Saciación). De esta manera, se prima las señales regulatorias procedentes del estómago ya que, aunque exista cierto vaciado gástrico natural durante la ingesta (Kaplan *et al.*, 1992), al no haber demora temporal entre la Saciación y la extracción intragástrica de nutrientes, la mayoría del contenido ingerido permanecería en el estómago (McHugh *et al.*, 1975). Sin embargo, no puede descartarse todavía que esta participación del PBle pudiera implicar información tanto gástrica como post-gástrica, una cuestión aún por determinar.

En apoyo de la propuesta gástrica, estudios llevados a cabo por distintos autores han detectado neuronas en el PBle, entre otros núcleos, que son especialmente sensibles a la distensión gástrica (Suemori *et al.*, 1994; Baird *et al.*, 2001a, b; Berthoud *et al.*, 2001; Vrang *et al.*, 2003; Mazda *et al.*, 2004).

Sin embargo, los datos del Experimento 6 ponen de manifiesto la ausencia de diferencias, entre el grupo lesionado en el PBle y su control, en las cantidades de alimento líquido consumidas hasta cumplir el criterio de Saciación (5 min. sin consumir), en contraste con el proceso rápido de re-ingesta tras la extracción de contenido gástrico que se acaba de describir. Estos datos sugieren, de nuevo, que las lesiones del PBle no parecen afectar específicamente al proceso de Saciación y que otros mecanismos alternativos podrían ser responsables de dicho proceso cuando el animal posee el suficiente tiempo como para poder poner en marcha estos sistemas compensatorios (por ejemplo, vías vagales y no vagales que proyecten a otro centro cerebral distinto al PBle o Saciedad Condicionada).

En cualquier caso, los resultados obtenidos sugieren que el PBle podría formar parte esencial de los sistemas neurales implicados en los procesos de control de la ingesta de alimentos a Corto Plazo. Acorde con esta idea, existen estudios que han mostrado que el PBle podría formar parte del eje visceral Vago-NTSc a través del cual se procesa la información procedente del tracto gastrointestinal que estaría implicada en la regulación de la ingesta de alimentos (Calingasan y Ritter, 1993; Li y



Rowland, 1995, 1996; Horn y Friedman, 1998a,b; Horn *et al.*, 2001; Trifunovic y Reilly, 2001; Abbott *et al.*, 2005; Becskei *et al.*, 2007). Así, de acuerdo con los datos obtenidos en el Experimento 6, el eje Vago-NTSc-PBle sería relevante en aquellas circunstancias en las que se requiere una detección y procesamiento rápido de la información visceral. Por lo tanto, las lesiones del PBle no parecen afectar a la regulación de la Saciación, pero cuando la manipulación introducida (extracción gástrica) debe ser rápidamente detectada e inmediatamente compensada la relevancia del PBle es capital.

Acorde con esta última idea se ve apoyada por los resultados obtenidos en el ámbito del Aprendizaje Interoceptivo, en los que se ha comprobado que la integridad de los componentes del eje Vago-NTSc-PBle parece esencial sólo en aquellas tareas que requieren una rápida detección de los productos administrados intragástricamente que serán asociados a los estímulos gusto-olfatorios (Arnedo *et al.*, 1991, 1993; Mediavilla *et al.*, 2000, 2011; Zafra *et al.*, 2002, 2006, 2007).

En cualquier caso, este estudio demuestra la relevancia del PBle para regular conductas nutritivas asociadas a cambios repentinos en el sistema digestivo, como las producidas tras la extracción de contenidos gástricos (Experimento 6).

Los datos correspondientes al Experimento 7, además de reproducir los resultados obtenidos previamente por este laboratorio (Zafra *et al.*, 2005) y otros (Takaki *et al.*, 1990) con respecto a las lesiones del PBl y, más específicamente, del PBle (Experimento 6), destacan por el efecto hiperfágico observado en animales lesionados particularmente en el CeL. Este resultado precisa (más específicamente) la hiperfagia y/o ganancia de peso obtenidas en animales con lesiones del CeA (Box y Mogenson, 1975; Leonard y Hahn, 1982; Bovetto y Richard, 1995; King *et al.*, 1993a, b; King *et al.*, 1994; King *et al.*, 1996; King *et al.*, 1997; King *et al.*, 1998; King *et al.*, 1999; Rollins y King, 2000; Rollins *et al.*, 2001) y está en consonancia con la relación viscero-sensorial que el PBle mantiene con algunos centros rostrales, como el CeA, y particularmente con el CeL (Bernard *et al.*, 1993) (ver Figura 0.3). De hecho, por ejemplo, se ha observado activación del CeA (incluido el CeL) tras la administración de productos aversivos (por ejemplo, HCl) que inducen AAvG (Ervin *et al.*, 1990) y que puede ser bloqueada mediante Vagotomías (Michl *et al.*, 2001).

Sin embargo, estudios llevados a cabo por el grupo de King (King *et al.*, 1993a, b; King *et al.*, 1996; King *et al.*, 1994; King *et al.*, 1997; King *et al.*, 1998; King *et al.*, 1999) han mostrado hiperfagia y obesidad moderada en roedores con lesiones bilaterales en

la región posterodorsal de la amígdala. Aunque los subnúcleos implicados en estas lesiones incluye al Núcleo Medial Posterodorsal y el Núcleo Lecho Intra-Amigdalino de la Estría Terminalis (King *et al.*, 1993a, b; King *et al.*, 2003; Rollins y King, 2000; Rollins *et al.*, 2006), un análisis histológico más detallado de estas lesiones demuestra que generalmente invaden la porción caudal del CeA (incluido el CeL) (Rollins y King, 2000).

Otros estudios, por el contrario, han observado una disminución en la ingesta de comida y en el peso corporal tras las lesiones del CeA (Anand y Brobeck, 1952; Fonberg, 1969; 1973; Cole, 1974; Box y Mogenson, 1975; Ganaraj y Jeganathan, 1998) aunque, conviene destacar, que estos animales suelen mostrar importantes déficits sensorio-motores (Box y Mogenson, 1975; Ganaraj y Jeganathan, 1998). Así, un análisis de las lesiones efectuadas en estos últimos estudios sugieren que la afagia producida tras la lesión del CeA ha podido ser debida al daño incidental de estructuras adyacentes no amigdalinas (Rollins y King, 2000) como, por ejemplo, el Globo Pálido cuyas lesiones suelen producir afagia al estar implicado en funciones sensorio-motoras (Morgane, 1961; Leonard *et al.*, 1975; Dacey y Grossman, 1977; Palfai *et al.*, 1984; Schoenfeld y Hamilton, 1981). Concretamente, algunos estudios han comprobado que las lesiones restringidas al CeA, sin daño adicional del Globo Pálido, no producen hipofagia, ni pérdida de peso o déficits sensorio-motores (Dacey y Grossman, 1977; Kemble *et al.*, 1979; Schoenfeld y Hamilton, 1981; Leonard y Hahn, 1982; Bovetto y Richard, 1995; Ritter y Hutton, 1995).

Por otra parte, aunque las lesiones de la Amígdala suelen alterar la respuesta normal a la novedad de los alimentos (neofobia), existen investigaciones que han observado esta disminución en la reacción neofóbica ocurre en animales con lesiones (excitotóxicas o electrolíticas) del Núcleo Basolateral de la Amígdala (BLA) (Rolls y Rolls, 1973; Nachman y Ashe, 1974; Borsini y Rolls, 1984; Kolakowska *et al.*, 1985; Kesner *et al.*, 1992; Burns *et al.*, 1996), pero no después de lesiones en otras zonas de la Amígdala o con una implicación parcial del BLA (Dunn y Everitt, 1988; Fitzgerald y Burton, 1981).

La relación funcional, dentro del eje neuroanatómico, entre el PBL y el CeL con respecto a los efectos hiperfágicos parece probable ya que ambos subnúcleos mantienen una comunicación bidireccional formando un circuito cerebral que ha sido implicado repetidamente en los procesos alimenticios normales. Esta red neural incluye también al Núcleo Paraventricular Hipotalámico (PV) y al Núcleo del Tracto

Solitario (NTS), entre otros (Norgren, 1976; Fulwiler y Saper, 1984; Herbert *et al.*, 1990; Moga *et al.*, 1990; Bernard *et al.*, 1993; Karimnamazi *et al.*, 2002).

Más aún, algunos estudios han sugerido que el incremento en la ingesta producido por la desactivación del PBl (que incluiría posiblemente al PBle) depende de mecanismos facilitadores de la ingesta presentes en CeA (Geerling y Loewy, 2006). Así, se podría pensar que las lesiones del PBl y, más concretamente, del PBle podrían inducir hiperfagia al provocar la interrupción del control inhibitorio ejercido por este núcleo pontino sobre el CeA.

En otras palabras, los datos disponibles sugieren que el PBl (concretamente el PBle) y su proyección anatómica hacia el CeA (particularmente hacia el CeL) (Bernard *et al.*, 1993) servirían como sistema cerebral a través del cual las aferencias viscero-sensoriales, tanto desde la periferia como desde estructuras cerebrales relacionadas con la alimentación, convergen e interactúan fisiológicamente.

Los estudios con Estimulación Eléctrica Intracerebral del PBle (Simón *et al.*, 2007) ofrecen un cierto apoyo a los efectos hiperfágicos observados tras las lesiones del CeA o del PBle. La Estimulación Eléctrica del PBle genera preferencias o aversiones hacia los sabores con los que es asociada (Simón *et al.*, 2007), mientras que la región parabraquial lateral en su conjunto (Treit y Berridge, 1990; Berridge y Pecina, 1995; Wang *et al.*, 1999; Söderpalm y Berridge, 2000; Yamamoto y Sawa, 2000a, b; Simón *et al.*, 2007) o el CeA (Schoenbaum *et al.*, 1990; Blass y Hoffmeyer, 1991; Barr *et al.*, 1995; D'Anci *et al.*, 1996; Blass, 1997; Ren *et al.*, 1997; Kanarek *et al.*, 1999; Pomonis *et al.*, 2000) han sido implicados, de un modo u otro, en los procesos orosensoriales asociados a las propiedades reforzantes de ciertos estímulos gustativos “innatamente preferidos” (por ejemplo, Sacarosa) que son procesados a través del Sistema Opiáceo (Kirkham y Cooper, 1988a, b; Yu *et al.*, 1999; Pomonis *et al.*, 2000; Zhang y Kelley, 2000, 2002; Will *et al.*, 2003; Levine y Billington, 2004; Richardson *et al.*, 2005).

De acuerdo con todo ello, se podría proponer que estas lesiones provocan una cierta insensibilidad a las propiedades hedónicas de las sustancias apetitivas (disminución de la “Discriminación Estimular”) provocando así una mayor ingesta compensatoria con respecto a los animales controles. Es decir, los animales lesionados en el CeL o PBle podrían no detectar las propiedades hedónicas de los alimentos compensándolo así con una mayor ingesta que contrarrestaría dicha carencia. Un efecto similar ha sido observado en personas de cierta edad que

muestran mayor preferencia por las sustancias dulces, presumiblemente porque han perdido cierta capacidad para captar las propiedades de las sustancias placenteras (Murphy, 1993). Esta sensibilidad hedónica disminuida hace que las personas de cierta edad consuman mayores cantidades como compensación (Pangborn *et al.*, 1983; Murphy y Withee, 1986; De Graaf *et al.*, 1996) .

El hecho de que el sistema Opiáceo esté implicado en las preferencias inducidas tras la Estimulación Eléctrica del PBle (Simón *et al.*, 2007; Experimento 4) parece compatible con todo lo anterior.

Así, las lesiones del PBl, del PBle y, ahora, del CeL generan un efecto de hiperfagia hacia sustancias apetitivas que se reduce tras la administración de Naloxona, un fármaco antagonista opiáceo que parece reducir las propiedades hedónicas (Kirkham y Blundell, 1986; Higgs y Cooper, 1997; Glass *et al.*, 1999b; Zhang y Kelley, 2000, 2002; Frisina y Sclafani, 2002; Koob *et al.*, 2003) y/o post-ingestivas (Kirkham y Blundell, 1984, 1986; Glass *et al.*, 1999b, 2000) de los nutrientes apetitivos. Sin embargo, esta acción anoréxica de la Naloxona puede ser parcialmente contrarrestada a través de lesiones del PBle que atenúan su efecto inhibitorio sobre la ingesta (Experimento 7).

Existen estudios anatómicos que demuestran que los receptores opiáceos están ampliamente expresados tanto en la periferia (por ejemplo, estómago) como a nivel central (por ejemplo, PBle) (Mansour *et al.*, 1995a, b; Cheng *et al.*, 1996; Ding *et al.*, 1996; Guan *et al.*, 1997; Chamberlin *et al.*, 1999) y que la información viscerosensorial del sistema gastrointestinal asciende hacia el Tronco Cerebral (por ejemplo, PBle) y, desde allí, hacia estructuras diencefálicas implicadas en la regulación energética (por ejemplo, Hipotálamo, Tálamo y Amígdala) (Saper y Lowey, 1980; Moga *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1992, 1993). Así, se podría proponer que las lesiones del PBle atenúan la acción anoréxica de la Naloxona al haber eliminado, de nuevo, la señal viscerosensorial vagal que confluye en este subnúcleo parabraquial (Bernard *et al.*, 1993). La interrupción de la información de Saciación a nivel del PBle por parte de la Naloxona impediría que las estructuras cerebrales rostrales desempeñaran su función normal de regulación de la ingesta.

Sin embargo, el hecho de que las lesiones del PBle no bloqueen completamente la acción inhibitoria de la Naloxona sobre la ingesta (sólo se produce una atenuación) sugiere que aunque dicho subnúcleo reciba densas proyecciones viscerosensoriales (Bernard *et al.*, 1993) éstas también pueden ser trasladadas a otros sustratos cerebrales

que permanecen intactos en estos animales lesionados (por ejemplo, Hipotálamo, Tálamo, Corteza Insular) (Fulwiler y Saper, 1984; Herbert *et al.*, 1990; Moga *et al.*, 1990; Bernard *et al.*, 1993; Krukoff *et al.*, 1993; Krukoff *et al.*, 1994; Saleh y Cechetto, 1993; Bourgeais *et al.*, 2001).

Un examen de los datos ofrecidos por otros experimentos en estos procesos motivacionales permite constatar que entre las áreas “marcadas” se incluye el PBL. De hecho, diversos estudios inmunohistoquímicos incluyen al PBL (junto a otros muchos núcleos) entre los centros activados tras la administración periférica de productos generadores de glucoprivación (por ejemplo, 2,5-AM) o con glucosa administrada intraduodenalmente (Ritter *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1999), un efecto que puede ser eliminado mediante la aplicación de Vagotomías (Ritter *et al.*, 1994; Calingasan y Ritter, 1993).

Más aún, péptidos reguladores del consumo de los principales macro-nutrientes, como el NP-Y (carbohidratos), la Galanina (grasas) y la ‘hormona liberadora de la hormona del crecimiento’ (proteínas), también son procesados por redes de núcleos entre los cuales se incluye el PBL (Smith *et al.*, 1985; Petrov *et al.*, 1992a; 1992b; Krukoff *et al.*, 1993; Veening *et al.*, 1998; Koegler *et al.*, 1999; Bray, 2000).

En particular, el PBL ha sido relacionado con el Sistema Opiáceo y la nutrición. La función de las sustancias opiáceas con respecto a la nutrición implica principalmente una modulación de las propiedades motivacionales de la comida, incrementando su valor como incentivo (Apfelbaum y Mandenoff, 1981; Drewnowski *et al.*, 1992; Le Magnen, 1992) y también reduciendo estados de malestar general como es el caso del hambre (Carr y Papadouka, 1994). Los receptores opiáceos  $\mu$  y  $k$  han sido relacionados, a su vez, con ambos efectos y ello en lugares cerebrales específicos (Carr y Papadouka, 1994; Papadouka y Carr, 1994). Por ejemplo, la restricción de alimento genera hiper-actividad de los receptores  $k$  e hipo-actividad de los  $\mu$  en el PBL (Wolinsky *et al.*, 1996).

También el consumo de sustancias apetitivas (por ejemplo, Sacarina, Sacarosa, Lactosa, Glucosa, etc.) activan, entre otros núcleos cerebrales, al PBL (Yamamoto *et al.*, 1994; Monroe y Di Lorenzo, 1995; Wang *et al.*, 1999; Yamamoto y Sawa, 2000a, 2000b), lo cual sugiere que esta zona incluye neuronas sensibles a las cualidades sensoriales de los estímulos gustativos (Yamada *et al.*, 1990; Halsell y Frank, 1992; Halsell y Travers, 1997) mientras que otras codifican su valor motivacional (Yamamoto *et al.*, 1994). Estas células han sido localizadas tanto en la división medial

como en la parte lateral del complejo parabraquial (Yamamoto *et al.*, 1994).

En relación con la implicación del eje Vagal-PBle-CeA en la acción anoréxica central de la Naloxona, Buller y colaboradores (2005) han disociado entre la Naloxona Hidroclorhídrica (NxH), con acción periférica central, y la acción exclusivamente periférica de la Naloxona Metiodide (NxM) (Brown y Goldberg, 1985). Así, este estudio muestra un aumento en la expresión *c-fos* en el subnúcleo PBle (entre otros núcleos cerebrales) tras la administración intra-arterial de NxM por comparación con la administración de vehículo, sin que se observe un efecto inmunohistoquímico adicional cuando se compara con la administración intra-arterial de NxH (Buller *et al.*, 2005). Esto es, la actividad de las células del PBle estaría tónicamente inhibida tanto por los receptores opiáceos localizados central como periféricamente. Sin embargo, el hecho de que el número de células Fos-positivas en el PBle, después del bloqueo sistémico o periférico, no es significativamente distinto, sugiere que los receptores opiáceos periféricos (más que los centrales) estarían implicados en mayor medida en la activación de las células del PBle (Buller *et al.*, 2005). Por el contrario, la NxH (y no la NxM) aumenta la expresión de *c-fos* en el CeA (Buller *et al.*, 2005), lo cual sugiere que esta activación sería dependiente de la disminución en la inhibición que sobre él ejercería otro centro encefálico, presumiblemente, el PBle. En otras palabras, el hecho de que el Sistema Opiáceo Endógeno pueda modificar la actividad del PBle y ésta, a su vez, alterar a través de su control inhibitorio la actividad de estructuras como el CeA (incluido el CeL), ofrece una posibilidad de que el Sistema Opiáceo puede modular el comportamiento motivado, las emociones, el apetito y el control autonómico central (Buller *et al.*, 2005).

Otros estudios han confirmado que la acción anoréxica se puede inducir tanto a nivel central como periférico, implicando en cada caso distintas estructuras cerebrales. Así, por ejemplo, se ha comprobado que la acción anoréxica inducida por la Fenfloramina (DFEN) se produce a nivel central (Blundell y Leshem, 1974; Li y Rowland, 1993; Grill *et al.*, 1997), mientras que la de la Colicistoquinina (CCK) ocurre a nivel periférico (Herbert y Saper, 1990; Takaki *et al.*, 1990; Li y Rowland, 1995; Trifunovic y Reilly, 2001). También se ha demostrado que las lesiones del PBl (incluido el PBle) atenúa la anorexia inducida por DFEN y elimina la expresión *c-fos* inducida por ella en el CeA (Li *et al.*, 1994), mientras que la administración periférica de CCK aumenta la expresión *c-fos* en el PBl (incluido el PBle) y en el CeA (Li y Rowland, 1994, 1995; Mayne *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998), un efecto que es

suprimido mediante Vagotomías (Li y Rowland, 1995). Finalmente, mientras que lesiones del PB Dorsal y del PB Medial incrementan las propiedades anoréxicas de la CCK (Takaki *et al.*, 1990; Trifunovic y Reilly, 2001), las lesiones del PBL (incluido el PBle) bloquean completamente dicha anorexia (Trifunovic y Reilly, 2001).

El hecho de que las lesiones del PBle, llevadas a cabo en el Experimento 7, atenúen la acción anoréxica de la Naloxona destaca la participación de las estructuras centrales, aunque con los datos de la presente investigación no se puede excluir la posibilidad de que su acción haya podido ocurrir a nivel periférico.

De acuerdo con todos estos planteamientos, se podría proponer que el eje neuroanatómico Vagal-PBle-CeL podría ser el sustrato neural responsable de los procesos nutritivos a Corto Plazo mediados por el Sistema Opiáceo. El efecto hiperfágico mostrado por los animales con lesiones en sus distintos componentes (PBle o CeL) es bloqueado por la administración subcutánea de Naloxona (Experimento 7), presumiblemente a través de una disminución en las propiedades hedónicas y/o post-ingestivas de dicha sustancia apetitiva. La potencia anoréxica inducida por la Naloxona ocurriría a través del bloqueo de los receptores opiáceos presentes en los circuitos neurales que procesan las señales orosensoriales y/o postingestivas (Glass *et al.*, 2001).

En resumen, se podría sugerir que el Nervio Vago, a través de proyecciones inhibitorias y del Sistema Opiáceo, actuaría sobre el PBle, y éste a su vez, mediante una vía inhibitoria, sobre el CeL. De esta manera, los reforzadores naturales (por ejemplo, la comida o la conducta sexual) y las drogas de abuso, al inhibir al PBle, induciría un incremento en la activación del CeL (bloqueo del control inhibitorio). Por el contrario, los antagonistas opiáceos como la Naloxona disminuirían la acción inhibitoria opiácea del Nervio Vago sobre el PBle, interrumpiendo la inhibición opiácea de dicha estructura pontina y la consiguiente modificación de las funciones del CeL.

Para finalizar, los resultados del Capítulo IV muestran que los antagonistas opiáceos (Naloxona), aunque disminuye la ingesta de sustancias apetitivas, también parece interrumpir el proceso de adquisición Implícita del procedimiento de la modalidad Concurrente del AAvG (a Corto Plazo) (Experimento 8), sin afectar a la retención/expresión de dicho aprendizaje una vez adquirido (Experimento 9) ni

tampoco a la adquisición Explícita del aprendizaje en la modalidad Secuencial (a Largo Plazo) (Experimento 10).

Estos resultados sugieren que los antagonistas opiáceos podrían haber bloqueado el procesamiento de la información del eje neuroanatómico Vagal-PBle-CeA que, como ya se ha comentado, es el sustrato neural esencial en estos procesos adquisitivos (Rabin *et al.*, 1985; Arnedo y Puerto, 1986; Arnedo *et al.*, 1989, 1990, 1991; Arnedo *et al.*, 1993; Bechara *et al.*, 1993; Sakai y Yamamoto, 1998; Mediavilla *et al.*, 2000; Reilly y Trifunovic, 2000a, b, 2001; Zafra *et al.*, 2002; Capítulo I y II) y nutritivos (Treit y Spetch, 1986; Takaki *et al.*, 1990; Bernard *et al.*, 1993; Suemori *et al.*, 1994; Chavez *et al.*, 1997; Phillips y Powley, 1998; Kelly *et al.*, 1999; Baird *et al.*, 2001a, b; Bourgeois *et al.*, 2001; Zafra *et al.*, 2003, 2004, 2005; Capítulo III) a Corto Plazo, esto es, de índole rápida.

Esta interpretación es compatible con los resultados obtenidos en estudios que demuestran que la administración de Naloxona reduce la activación característica del PBle después de la inyección de productos nocivos que generan inmunodepresión (Buller *et al.*, 2005). Esto es, el antagonismo opiáceo podría ejercer una acción inhibitoria sobre el eje Vagal-PBle, y concretamente sobre aquellos procesos comportamentales en los que su participación sea decisiva (Arnedo y Puerto, 1986; Arnedo *et al.*, 1990; 1991; Arnedo *et al.*, 1993; Mediavilla *et al.*, 2000; Simón *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta las conexiones inhibitorias existentes entre el PBle y el CeA (Saper y Lowey, 1980; Cechetto, 1987; Moga *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1992; Bernard *et al.*, 1993; Jia *et al.*, 1994; Suemori *et al.*, 1994), esta alteración de la actividad parabraquial puede afectar al complejo amigdalino y a los procesos en los que éste está implicado como, por ejemplo, el AAvG Concurrente (Experimento 2).

Por otra parte, conviene destacar que si bien los animales del Experimento 8 tratados con Naloxona no logran desarrollar el AAvG Concurrente habitual, sin embargo, en la Prueba de Inversión (Mediavilla *et al.*, 2001), utilizada para comprobar la modalidad adquisitiva utilizada por los animales (Implícita o Explícita), se observa que los animales tratados con Naloxona durante 7 días realizan correctamente la tarea discriminativa, esto es, habrían aprendido de manera Secuencial, esto es, de manera flexible/explicita (Mediavilla *et al.*, 2001). No ocurre lo mismo con los animales controles, incapaces de superar dicha Prueba de Inversión, que habría sido aprendida de manera Concurrente (Implícita). En otras palabras, la administración de



Naloxona habría modificado las estrategias adquisitivas de estos animales utilizando ahora procedimientos Explícitos en tareas Concurrentes de AAvG que serían resueltas habitualmente de manera Implícita.

Sin embargo, una vez que se ha producido la adquisición del AAvG Concurrente, otros centros cerebrales y sistemas neuroquímicos diferentes pueden ser los responsables de la retención/expresión de dicha adquisición, ya que ahora la administración de Naloxona no interrumpe la memoria establecida (Experimento 9).

En efecto, parece bien establecido que los sistemas implicados en el aprendizaje no siempre coinciden necesariamente con los circuitos neurales responsables del aprendizaje y la memoria (Lalonde y Botez, 1990; Lavond *et al.*, 1993; Bloedel y Bracha, 1995). Utilizando el AAvG Concurrente se ha demostrado, por ejemplo, que los núcleos profundos del Cerebelo son esenciales en los procesos adquisitivos pero no en la retención de los mismos (Mediavilla *et al.*, 2000). Resultados similares se han obtenido utilizando otros modelos de aprendizaje tales como el Condicionamiento de Evitación Pasiva (Guillaumin *et al.*, 1991), el Condicionamiento Clásico Parpebral en animales (Bracha *et al.*, 1998; Chen y Steinmetz, 2000) y en humanos (Bracha *et al.*, 1997), el Condicionamiento Operante del Movimiento del Antebrazo (Milak *et al.*, 1997), la Habitación a Largo Plazo de la Respuesta de Orientación (Leaton y Suple, 1991) y el Condicionamiento del Reflejo de Retirada (Marchetti-Gauthier *et al.*, 1990). Esta disociación anatómica no parece ser exclusiva del Cerebelo y así lesiones en el Núcleo Pedúnculo pontino impide el aprendizaje de tareas de Evitación sin afectar a su retención o su memoria (Fujimoto *et al.*, 1990); igualmente, la Amígdala parece esencial en la adquisición, pero puede no serlo en la retención del Miedo Condicionado (Lavond *et al.*, 1993).

Por otra parte, los datos obtenidos en el último estudio de esta serie experimental (Experimento 10) demuestran que el Sistema Opiáceo no estaría implicado en los procesos adquisitivos del AAvG Secuencial (a Largo Plazo/Explícita), ya que la administración de Naloxona no afecta a esta modalidad de aprendizaje.

Estos datos apoyan, sin embargo, la disociación propuesta anteriormente en relación con las dos modalidades de AAvG, Concurrente y Secuencial, y en el sentido de que se sustentan sobre sistemas neurales y funcionales diferentes (Arnedo *et al.*, 1990, 1991; Gallo *et al.*, 1992; Garcia, 1990; Agüero *et al.*, 1993a, b; Agüero *et al.*, 1997; Mediavilla *et al.*, 1998, 1999, 2001, 2005). Ahora se demuestra también utilizan sistemas neuroquímicos distintos (Capítulo IV) y que los Opiáceo son relevantes sólo

en la modalidad Concurrente (Implícita) sin que se conozca por el momento el neurotransmisor implicado en la modalidad Secuencial (Explícita).

En el estudio de Buller y colaboradores (2005), mencionado anteriormente, se demuestra que la activación de estructuras cerebrales tales como el PBle y el AP (tras la administración de sustancias que inducen inmunodepresión, Interleucina-1) queda modificada diferencialmente tras la administración de Naloxona (Buller *et al.*, 2005). Mientras que el subnúcleo PBle disminuye su actividad (en comparación con la administración única del producto nocivo), el AP, por el contrario, aumenta su activación (Buller *et al.*, 2005). Estos datos sugieren que la Naloxona podría impedir la adquisición del AAvG Concurrente al inhibir la actividad del PBle ante estímulos nocivos, un subnúcleo que se sabe que está implicado en esta modalidad adquisitiva (Mediavilla *et al.*, 2000; Simón *et al.*, 2007). Por su parte, los antagonistas opiáceos podrían facilitar la adquisición del AAvG Secuencial al aumentar la actividad del AP, una estructura que está implicada en el AAvG Secuencial (Ladowsky y Ossenkopp, 1986; Gallo *et al.*, 1988, 1990, 1991; Bernstein *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1992). Esta interpretación parece compatible con los resultados obtenidos en el Experimento 10 en el cual se observa que los animales a los que se les administra Naloxona discriminan entre los dos sabores utilizados en la tarea de AAvG Secuencial ya desde la primera (también en la segunda) asociación viscerogusto-olfatoria, algo que no ocurre en los animales que sólo recibieron la administración del Vehículo.

La relevancia del Sistema Opiáceo en el aprendizaje y la memoria está bien establecida, si bien no está exenta de controversia. Así, existen estudios que abogan por la idea de que el Sistema Opiáceo está implicado tanto en la adquisición como en la expresión de las preferencias por la dieta (Shide y Blass, 1991; Levine *et al.*, 2002), mientras que otras investigaciones no lo relacionan ni con la adquisición ni con la expresión de la preferencia (Yu *et al.*, 1999; Azzara *et al.*, 2000; Frisina y Sclafani, 2002; Baker *et al.*, 2004) y, en fin, un tercer grupo de autores implica al Sistema Opiáceo sólo en la expresión pero no en la adquisición de preferencias hacia un lugar inducidas por Sacarosa (Delameter *et al.*, 2000).

Los resultados del Capítulo IV aportan nuevos datos sobre esta controversia, sugiriendo que son las diferencias procedimentales de los experimentos (Concurrente vs. Secuencial) las que habrían puesto en función mecanismos estructurales y neuroquímicos diferentes (García *et al.*, 1985; Kiefer, 1985; Arnedo *et al.*, 1990, 1991;

Chambers, 1990; Gallo *et al.*, 1992; Garcia, 1990; Agüero *et al.*, 1993a, b; Agüero *et al.*, 1997; Mediavilla *et al.*, 1998, 1999, 2000, 2001, 2005).

De acuerdo con este planteamiento, los estudios que no consiguen interrumpir los procesos adquisitivos reforzantes con antagonistas opiáceos siempre utilizan procedimientos Secuenciales (Yu *et al.*, 1999; Azzara *et al.*, 2000; Delameter *et al.*, 2000; Frisina y Sclafani, 2002; Baker *et al.*, 2004). Sin embargo, sí lo logran los estudios en los que los antagonismos opiáceos bloquean las preferencias olfatorias inducidas por la administración intraoral (i.o.) de sustancias nutritivas rápidamente detectables (Shide y Blass, 1991), una característica distintiva de la modalidad Concurrente del AAvG (Garcia *et al.*, 1985; Kiefer, 1985; Chambers, 1990; Garcia, 1990; Mediavilla *et al.*, 2001, 2005), y así ocurre en los experimentos llevados a cabo en este laboratorio con la detección del NaCl administrado intragástricamente (Arnedo *et al.*, 1990, 1991; Arnedo *et al.*, 1993; Mediavilla *et al.*, 2000, 2001, 2005; Capítulo I) o con la Estimulación Eléctrica Intracerebral (Simón *et al.*, 2007; Capítulo II).

Por otra parte, diversos experimentos han demostrado que el bloqueo opiáceo puede inhibir la expresión de la preferencia por un lugar asociado tanto con Sacarosa (Delameter *et al.*, 2000) como por Morfina (Mucha *et al.*, 1982; Del Pozo *et al.*, 1996; Shippenberg y Elmer, 1998; Manzanedo *et al.*, 2001b). Las diferencias en las características del procedimiento adquisitivo utilizado en ambas series de experimentos pueden ser importantes. Así, en la prueba de elección con procedimientos experimentales de Condicionamiento de Preferencia hacia un Lugar (CPL) los reforzadores ya no están presentes, mientras que la acción aversiva *per se* de la Naloxona a dosis iguales o mayores de 2 mg/kg. (Brady y Holtzman, 1981; Mucha *et al.*, 1982; Mucha *et al.*, 1985; Kelsey *et al.*, 1984; Rodgers *et al.*, 1984; Schulteis *et al.*, 1994) hace que los animales, aunque mantengan un lugar preferido, no accedan a él porque se sienten mal y no porque no recuerden lo aprendido.

Sin embargo, en el procedimiento de AAvG Concurrente utilizado en el Capítulo IV, si bien el animal puede sentir malestar por la administración de Naloxona, el reforzador, tanto positivo (tiene sed) como negativo (puede evitar la consecuencia visceral aversiva) está presente y, de esta manera, necesita expresar lo aprendido.

El hecho de que se produzca un efecto diferencial en la acción de la Naloxona tanto sobre la adquisición de las distintas modalidades del AAvG (Concurrente y Secuencial) como entre la adquisición y retención/expresión de lo aprendido, excluye

la posibilidad de que el bloqueo de la adquisición de la modalidad Concurrente sea debido a los efectos aversivos (inespecíficos) de la Naloxona con dosis iguales o superiores a 2 mg/Kg. (Brady y Holtzman, 1981; Mucha *et al.*, 1982; Mucha *et al.*, 1985; Kelsey *et al.*, 1984; Rodgers *et al.*, 1984; Schulteis *et al.*, 1994). En ese caso, los animales (con Naloxona) tampoco deberían haber desarrollado el aprendizaje dentro de la modalidad Secuencial (Explícita) ni expresarían retención/expresión del AAvG Concurrente (Implícita).

Conjuntamente, todos estos datos sugieren que el efecto antagonista opiáceo de la Naloxona sobre las preferencias espaciales inducidas por la Estimulación Eléctrica del PBle (Simón *et al.*, 2007; Experimento 4) o su reducción anoréxica tras las lesiones del PBle (Experimento 7), además del bloqueo de la adquisición del AAvG Concurrente, podría suponer una acción sobre el PBle, uno de los núcleos responsables de dicho proceso adquisitivo (Mediavilla *et al.*, 2000; Simón *et al.*, 2007). La Naloxona ha podido modificar la actividad del PBle bloqueando el control inhibitorio opiáceo periférico al que está sometido por el Nervio Vago (hiperexcitabilidad), reduciendo así su activación tras la inyección de un producto nocivo (por ejemplo, NaCl hipertónico) (Buller *et al.*, 2005) y consecuentemente alterando los procesos adquisitivos mediados por este subnúcleo, el AAvG Concurrente. Asimismo y teniendo en cuenta las conexiones que mantiene el PBle con el CeA (Saper y Lowey, 1980; Cechetto, 1987; Moga *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1992; Bernard *et al.*, 1993; Jia *et al.*, 1994; Suemori *et al.*, 1994), esta modificación de la actividad del PBle ha debido alterar el funcionamiento del CeA y los procesos adquisitivos mediados por este subnúcleo, esto es, el AAvG Concurrente (Experimento 2).

Por otra parte, el eje neuroanatómico Vagal-PBle-CeA ha sido implicado en los procesos nutritivos a Corto Plazo (Zafra *et al.*, 2003, 2004, 2005 y Capítulo III) y así la anorexia de la Naloxona (Lynch y Libby, 1983; Kirkham y Cooper, 1988a, b; Cleary *et al.*, 1996; Giraudo *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1999) podría desencadenar un efecto hiperexcitador en el PBle, con la consiguiente alteración de los procesos nutritivos mediados por este subnúcleo pontino y, por ende, en su estructura diana (CeL) (Bernard *et al.*, 1993), modificando los procesos de Saciación a Corto Plazo (Capítulo III).

Resumiendo, los datos de la presente Tesis Doctoral abogan por la idea de que el eje neuroanatómico Vago-PBle-CeA estaría implicado tanto en los procesos

adquisitivos aversivos y reforzantes (AAvG y CPL, respectivamente) como nutritivos a Corto Plazo, procesos mediados a través del Sistema Opiáceo.

## **CONCLUSIONES**

- 1.- Las lesiones del subnúcleo Central de la Amígdala (CeA), un área de proyección visceral, interrumpe la adquisición del Aprendizaje Aversivo Gustativo (AAvG) en su modalidad Concurrente, pero sólo en el caso de que se acompañen de Bulbectomías Olfatorias.
- 2.- La Estimulación Eléctrica del CeA induce comportamientos consistentes de preferencia en pruebas de Condicionamiento Concurrente hacia un Lugar que, a diferencia del efecto reforzante parabraquial, no se ven afectados por la administración de Naloxona.
- 3.- Las lesiones del subnúcleo Parabraquial Lateral Externo (PBle) generan comportamientos hiperfágicos, con comida líquida o sólida ofrecida a Corto Plazo (60 y 90 min. respectivamente), pero no después de intervalos de 24 horas.
- 4.- Las lesiones del PBle distorsionan el mecanismo compensatorio de re-ingesta que se produce inmediatamente después de la extracción intragástrica parcial de alimentos previamente ingeridos.
- 5.- Lesiones del Área Parabraquial Lateral (PBl), o más específicamente del PBle, y del Subnúcleo Central Lateral de la Amígdala (CeL), generan comportamientos hiperfágicos de sustancias apetitivas como la Sacarosa.
- 6.- Las lesiones del PBle atenúan significativamente el efecto anoréxico de la Naloxona sobre el consumo de sustancias nutritivas apetitivas.
- 7.- A diferencia de los animales no tratados farmacológicamente, la administración de Naloxona modifica las estrategias adquisitivas de los animales que pasan a utilizar utilizando procedimientos Explícitos en tareas Concurrentes de AAvg que los animales de control resuelven de manera Implícita.
- 8.- En contraste, la administración de Naloxona no impide el proceso de retención del AAvg Concurrente (Implícito) ni la adquisición de la modalidad Secuencial del AAvg (Explícita), sino que incluso la facilita.



## **BIBLIOGRAFÍA**

- ABBOTT, C.R., MONTEIRO, M., SMALL, C.J., SAJEDI, A., SMITH, K.L., PARKINSON, J.R., GHATEI, M.A. Y BLOOM, S.R. (2005). The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3-36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. *Brain Res.*, 1044: 127-131.
- ACQUAS, E. Y DI CHIARA, G. (1992). Depression of mesolimbic dopamine transmission and sensitization to morphine during opiate abstinence. *J. Neurochem.*, May; 58(5): 1620-5.
- ACQUAS, E., CARBONI, E. Y DI CHIARA, G. (1991). Profound depression of mesolimbic dopamine release after morphine withdrawal in dependent rats. *Eur. J. Pharmacol.*, Jan 25; 193(1): 133-4.
- ADACHI, A. Y KOBASHI, M. (1985). Chemosensitive neurons within the area postrema of the rat. *Neurosci. Letters*, 55, 137-140.
- AGGLETON, J.P. Y PASSINGHAM, R.E. (1981). Syndrome produced by lesions of the amygdala in monkeys (*Macaca mulatta*). *J. Comp. Physiol. Psychology*, 95(6), 961-977.
- AGGLETON, J.P., PETRIDES, M. Y IVERSEN, S.D. (1981). Differential effects of amigdaloid lesions on conditioned taste aversions learning by rats. *Physiol. and Behav.*, 27, 397-400.
- AGMO, A., GALVAN, A. Y TALAMANTES, B. (1995). Reward and Reinforcement Produced by Drinking Sucrose: Two Processes That May Depend on Different Neurotransmitters. *Pharmacol. Biochemistry and Behavior*, 52 (2), 403-414.
- AGÜERO, A., ARNEDO, M., GALLO, M. Y PUERTO, A. (1993a). Lesions of the lateral parabrachial nuclei disrupt aversion learning induced by electrical stimulation of the area postrema. *Brain Res. Bull.*, 30(5-6): 585-92.
- AGÜERO, A., ARNEDO, M., GALLO, M. Y PUERTO, A. (1993b). The functional relevance of the lateral parabrachial nucleus in lithium chloride-induced aversion learning. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Aug; 45(4): 973-8.
- AGÜERO, A., GALLO, M., ARNEDO, M., MOLINA, F. Y PUERTO, A. (1997). The functional relevance of medial parabrachial nucleus in intragastric sodium chloride-induced short-term (concurrent) aversion learning. *Neurobiology of learning and memory*, Mar; 67(2); p.161-6
- AHIMA, R.S. Y FLIER, J.S. (2000). Leptin. *Annu. Rev. Physiol.*, 62: 413-37.
- AHIMA, R.S., SAPER, C.B., FLIER, J.S. Y ELMQUIST, J.K. (2000). Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol.*, Jul; 21(3): 263-307
- AJA, S., ROBINSON, B.M., MILLS, K.J., LADENHEIM, E.E. Y MORAN, T.H. (2002). Fourth ventricular CART reduces food and water intake and produces a conditioned taste aversion in rats. *Behav. Neurosci.*, 116(5), 918-921.
- ALBERTS, J.R. Y GALEF, B.G. Jr. (1971). Acute anosmia in the rat: a behavioral test of a peripherally-induced olfactory deficit. *Physiology & Behavior*, May; 6(5); p. 619-21.
- ALDEN, M., BESSON, J.M. Y BERNARD, J.F. (1994). Organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the bed nucleus of the stria terminalis and neighboring regions: a PHA-L study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, Mar 15; 341(3): 289-314.
- ALHEID, G.F., DE OLMOS, J.S. Y BELTRAMINO, C.A. (1995). Amygdala and Extended Amygdala. En Paxinos, G., *The Rat Nervous System*, Ed. Academic Press, 495-578.
- ALLEN, G.J., HARTL, T.L., DUFFANY, S., SMITH, S.F., VANHEEST, J.L., ANDERSON, J.M., HOFFMAN, J.R., KRAEMER, W.J. Y MARESH, C.M. (2003). Cognitive and motor function after administration of hydrocodone bitartrate plus ibuprofen, ibuprofen alone, or placebo in healthy subjects with exercise-induced muscle damage: a randomized, repeated-dose, placebo-controlled study. *Psychopharmacology (Berl.)*, Mar; 166(3): 228-33.
- ALTSCHULER, S.M., BAO, X., BIEGER, D., HOPKINS, D.A. Y MISELIS, R.R. (1989). Viscerotopic representation of upper alimentary tract in the rat: sensory ganglia and nuclei of the solitary and spinal trigeminal tracts. *J. Comp. Neurol.*, 283: 248-268
- ALTSCHULER, S.M., RINAMAN, L. Y MISELIS, R.R. (1992). Viscerotopic representation of the alimentary tract in the dorsal and ventral vagal complexes in the rat. En Ritter, S., Ritter, R.C. y Barnes, C.D. (Eds.). *Neuroanatomy and Physiology of Abdominal Vagal Afferents*, (pp. 21-53), CRC press.



- AMARAL, D.G., PRICE, J.L., PITKÄNEN, A. Y THOMAS, S. (1992). Anatomical Organization of the Primate Amygdaloid Complex. En Aggleton, J.P., *The Amygdala. Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction*. Ed. Wiley-Liss, 1-66.
- AMORAPANATH, P., LE DOUX, J.E. Y NADER, K. (2000). Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus. *Nat. Neurosci.*, Jan; 3(1): 74-9.
- ANAND, B.K. Y BROBECK, J.R. (1952). Food intake and spontaneous activity of rats with lesions in the amygdaloid nuclei. *Journal of neurophysiology*, Sep; 15(5); p. 521-30
- ARBISI, P.A., BILLINGTON, C.J. Y LEVINE, A.S. (1999). The effect of naltrexone on taste detection and recognition threshold. *Appetite*, Apr; 32(2): 241-9
- ARNEDO, M. Y PUERTO, A. (1986). Funciones del nervio vago en el aprendizaje interoceptivo. *Revista de Psicología General y Aplicada.*, 41(31), 487-494
- ARNEDO, M., GALLO, M., AGÜERO, A. Y PUERTO, A. (1989). Effects of medullary afferent vagal axotomy and area postrema lesions on short-term induced taste aversion learning. *Physiol. and Behav.*, 47, 1067-1074
- ARNEDO, M., GALLO, M., AGÜERO, A. Y PUERTO, A. (1990). Effects of medullary afferent vagal axotomy and area postrema lesions on short-term and long-term NaCl-induced taste aversion learning. *Physiol. Behav.*, 47(6), 1067-74
- ARNEDO, M., GALLO, M., AGÜERO, A. Y PUERTO, A. (1991). Differential effects of subdiaphragmatic vagotomy on NaCl-induced aversion learning. *Behav. Neural Biol.*, Mar; 55(2): 141-53
- ARNEDO, M., GALLO, M., AGÜERO, A., MOLINA, F. Y PUERTO, A. (1993). Medullary afferent vagal axotomy disrupts NaCl-induced short-term taste aversion learning. *Behav. Neural Biol.*, Jan; 59(1): 69-75
- ARNOULD, C. Y AGMO, A. (1999). The importance of the stomach for conditioned place preference produced by drinking sucrose in rats. *Psychobiology*, 27(4): 541-546.
- ARSENOS, G. Y KYRIAZAKIS, I. (2001). Does previous protein feeding affect the response of sheep towards foods that differ in their rumen availability, but not content, of nitrogen?. *Physiology & behavior*, Mar; 72(4); p. 533-41.
- ARVANITOGIANNIS, A., FLORES, C. Y SHIZGAL, P. (1997). Fos-like immunoreactivity in the caudal diencephalon and brainstem following lateral hypothalamic self-stimulation. *Behavioural brain research*, Nov; 88(2); p. 275-9.
- ARVANITOGIANNIS, A., FLORES, C., PFAUS, J.G. Y SHIZGAL, P. (1996). Increased ipsilateral expression of Fos following lateral hypothalamic self-stimulation. *Brain Res.*, May 13; 720(1-2): 148-54.
- ARVANITOGIANNIS, A., TZSCHENTKE, T.M., RISCALDINO, L., WISE, R.A. Y SHIZGAL, P. (2000). Fos expression following self-stimulation of the medial prefrontal cortex. *Behavioural brain research*, Jan; 107(1-2); p. 123-32
- ASAKAWA, A., INUI, A., INUI, T., KATSUURA, G., FUJINO, M.A. Y KASUGA, M. (2002). Orexin reverses cholecystokinin-induced reduction in feeding. *Diabetes Obes. Metab.*, Nov; 4(6): 399-40
- ASTON-JONES, G., DELFS, J.M., DRUHAN, J. Y ZHU, Y. (1999). The bed nucleus of the stria terminalis. A target site for noradrenergic actions in opiate withdrawal. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Jun 29; 877; p. 486-98
- ATWEH, S.F. Y KUCHAR, M.J. (1977). Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. II. The brain stem. *Brain Res.*, Jun 24; 129(1): 1-12.
- AZZARA, A.V., BODNAR, R.J., DELAMATER, A.R. Y SCLAFANI, A. (2000). Naltrexone fails to block the acquisition or expression of a flavor preference conditioned by intragastric carbohydrate infusions. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Nov; 67(3): 545-57.
- BAIRD, J.P., TRAVERS, J.B. Y TRAVERS, S.P. (2001a). Parametric analysis of gastric distension responses in the parabrachial nucleus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, Nov; 281(5): R1568-80
- BAIRD, J.P., TRAVERS, S.P. Y TRAVERS, J.B. (2001b). Integration of gastric distension and gustatory responses in the parabrachial nucleus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, Nov; 281(5): R1581-93
- BAKER, B.J. Y BOOTH, D.A (1989). Preference conditioning by concurrent diets with delayed proportional reinforcement. *Physiology & Behavior*, 46, 585-590
- BAKER, R.W., LI, Y., LEE, M.G., SCLAFANI, A. Y BODNAR, R.J. (2004). Naltrexone does not prevent acquisition or expression of flavor preferences conditioned by fructose in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Jun; 78(2): 239-46

- BARDO, M.T. Y BEVINS, R.A. (2000). Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward?. *Psychopharmacology (Berl)*, Dec; 153(1): 31-43
- BARNES, C.A., FOSTER, T.C., RAO, G. Y McNAUGHTON, B.L. (1991). Specificity of functional changes during normal brain aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 640; p. 80-5
- BARR, R.G., YOUNG, S.N., WRIGHT, J.H., CASSIDY, K.L., HENDRICKS, L., BEDARD, Y., YAREMKO, J., LEDUC, D. Y TREHERNE, S. (1995). "Sucrose analgesia" and diphtheria-tetanus-pertussis immunizations at 2 and 4 months. *Journal of developmental and behavioral pediatrics: JDBP*, Aug; 16(4); p. 220-5
- BARRACO, R., EL-RIDI, M., ERGENE, E., PARIZON, M. Y BRADLEY, D. (1992). An atlas of the rat subpostremal nucleus tractus solitarius. *Brain Res. Bull.*, 29(6): 703-765
- BAXTER, M.G. Y MURRAY, E.A. (2002). The amygdala and reward. *Nat. Rev. Neurosci.*, Jul; 3(7): 563-73.
- BECHARA, A. Y VAN DER KOOY, D. (1992a). A Single Brain Stem Substrate Mediates the Motivational Effects of Both Opiates and Food in Nondeprived Rats but not in Deprived Rats. *Behavioral Neuroscience*, 106 (2), 351-363.
- BECHARA, A. Y VAN DER KOOY, D. (1992b). Lesions of the Tegmental Pedunculopontine Nucleus: Effects on the Locomotor Activity Induced by Morphine and Amphetamine. *Pharmacol., Biochem. & Behav.*, 42, 9-18.
- BECHARA, A., MARTIN, G.M., PRIDGAR, A. Y VAN DER KOOY, D. (1993). The Parabrachial Nucleus: A Brain-Stem Substrate Critical for Mediating the Aversive Motivational Effects of Morphine. *Behav. Neurosci.*, 107(1), 147-160.
- BECSKEI, C., GRABLER, V., EDWARDS, G.L., RIEDIGER, T. Y LUTZ, T.A. (2007). Lesion of the lateral parabrachial nucleus attenuates the anorectic effect of peripheral amylin and CCK. *Brain Res.*, 1162: 76-84.
- BECZKOWSKA, I.W., KOCH, J.E. Y BODNAR, R.J. (1992). Naltrexone, serotonin receptor subtype antagonists, and glucoprivic intake: 1. 2-Deoxy-D-glucose. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Aug; 42(4): 661-70
- BECZKOWSKA, I.W., KOCH, J.E., BOSTOCK, M.E., LEIBOWITZ, S.F. Y BODNAR, R.J. (1993). Central opioid receptor subtype antagonists differentially reduce intake of saccharin and maltose dextrin solutions in rats. *Brain Res.*, Aug 6; 618(2): 261-70
- BELL, F.R., DENNIS, B. Y SLY, J. (1979). A study of olfaction and gustatory senses in sheegnep after olfactory bulbectomy. *Physiology & Behavior*; Nov; 23(5); p. 919-24
- BERKE, J.D. Y HYMAN, S.E. (2000). Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron*, Mar; 25(3); p. 515-32
- BERMAN, Y.L., RATTAN, A.K., CARR, K. Y DEVI, L. (1994). Regional distribution of neuropeptide processing endopeptidases in adult rat brain. *Biochimie*, 76(3-4); p. 245-50
- BERMUDEZ-RATTONI, F., GRITALVA, C., KIEFER, S. Y GARCÍA, J. (1986). Flavor illness aversions: the role of the amigdala in the acquisition of taste potentiated odor aversions. *Physiol. and Behav.*, 38, 503-508.
- BERMUDEZ-RATTONI, F. Y McGAUGH, J.L. (1991). Insular cortex and amigdala lesions differentially effect acquisition of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Res.*, 549, 165-170.
- BERNARD, J.F. Y BESSON, J.M. (1990). The spino(trigemino)pontoamygdaloid pathway: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J. Neurophysiol.*, Mar; 63(3): 473-90.
- BERNARD, J.F., ALDEN, M. Y BESSON, J.M. (1993). The organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the amygdaloid complex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, Mar 8; 329(2): 201-29.
- BERNARD, J.F., CARROUE, J. Y BESSON, J.M. (1991). Efferent projections from the external parabrachial area to the forebrain: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neurosci. Lett.*, Jan 28; 122(2): 257-60
- BERNARD, J.F., HUANG, G.F. Y BESSON, J.M. (1994). The parabrachial area: electrophysiological evidence for an involvement in visceral nociceptive processes. *J. Neurophysiol.*, May; 71(5): 1646-60
- BERNSTEIN, I.L. (1999). Food aversion learning: a risk factor for nutritional problems in the elderly? *Physiology & behavior*, Apr; 66(2); p. 199-201.
- BERNSTEIN, I.L., CHAVEZ, M., ALLEN, D. Y TAYLOR, E.M. (1992). Area postrema mediation of physiological and behavioral effects of lithium chloride in the rat. *Brain Res.*, 575(1), 132-137.
- BERRIDGE, K.C. (1996). Food reward: brain substrates of wanting and liking. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 20(1); p. 1-25.

- BERRIDGE, K.C. (2003). Pleasures of the brain. *Brain Cogn.*, Jun; 52(1): 106-28
- BERRIDGE, K.C. Y PECIÑA, S. (1995). Benzodiazepines, appetite, and taste palatability. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, Spring; 19(1): 121-31.
- BERRIDGE, K.C. Y TREIT, D. (1986). Chlordiazepoxide directly enhances positive ingestive reactions in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Feb; 24(2): 217-21
- BERTHOUD, H.R. (2008). The vagus nerve, food intake and obesity. *Regulatory Peptides*, 149: 15-25.
- BERTHOUD, H.R. Y NEUHUBER, W.L. (2000). Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton. Neurosci.*, Dec 20; 85(1-3): 1-17
- BERTHOUD, H.R. Y MÜNZBERG (2011). The lateral hypothalamus as integrator of metabolic and environmental needs: From electrical self-stimulation to opto-genetic. *Physiology and Behavior*, 104: 29-39
- BERTHOUD, H.R., PATTERSON, L.M., WILLING, A.E., MUELLER, K., Y NEUHUBER, W.L. (1997). Capsaicin-resistant vagal afferent fibers in the rat gastrointestinal tract: anatomical identification and functional integrity. *Brain Res.*, Jan 23; 746(1-2): 195-206.
- BERTINO, M., BEAUCHAMP, G.K. Y ENGELMAN, K. (1991). Naltrexone, an opioid blocker, alters taste perception and nutrient intake in humans. *Am. J. Physiol.*, Jul; 261(1 Pt 2): R59-63.
- BESTER, H., BOURGEOIS, L., VILLANUEVA, L., BESSON, J.M. Y BERNARD, J.F. (1999). Differential projections to the intralaminar and gustatory thalamus from the parabrachial area: a PHA-L study in the rat. *The Journal of comparative neurology*, Mar 22; 405(4): p. 421-49
- BHANDARI, P., BINGHAM, S. Y ANDREWS, P.L. (1992). The neuropharmacology of loperamide-induced emesis in the ferret: the role of the area postrema, vagus, opiate and 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Neuropharmacology*, Aug; 31(8); p. 735-42
- BIELAJEW, C. Y SHIZGAL, P. (1986). Evidence implicating descending fibers in self-stimulation of the medial forebrain bundle. *J. Neurosci.*, Apr; 6(4): 919-29.
- BIELAJEW, C., DIOTTE, M. Y MILAREISIS, E. (2003). Effects of naloxone on rewarding and aversive brain sites. *Behavioral Brain Research*, 143: 75-83.
- BILLINGSLEY, M.L. Y KUBENA, R.K. (1978). The effects of naloxone and picrotoxin on the sedative and anticonflict effects of benzodiazepines. *Life Sci.*, Mar; 22(10): 897-906
- BIRK, J. Y NOBLE, R.G. (1981). Naloxone antagonism of diazepam-induced feeding in the Syrian hamster. *Life Sci.*, Sep 14; 29(11): 1125-31
- BITTERMAN, M.E. (1975). The comparative analysis of learning. Are the laws of learning the same in all animals? *Science*, 188, 699-709.
- BLACKSHAW, L.A., PAGE, A.J. Y PARTOSOEDARSO, E.R. (2000). Acute effects of capsaicin on gastrointestinal vagal afferents. *Neuroscience*, 96(2): 407-16
- BLACKSHAW, L.A. Y GRUNDY, D. (1989). Responses of vagal efferent fibres to stimulation of gastric mechano- and chemoreceptors in the anaesthetized ferret. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 27(1), 39-45.
- BLAIR-WEST, J.R., DENTON, D.A., MCKINLEY, M.J. Y WEISINGER, R.S. (1992). Thirst and brain angiotensin in cattle. *The American journal of physiology*, Feb; 262(2 Pt 2); p. R204-10.
- BLASS, E.M. (1997). Milk-induced hypoalgesia in human newborns. *Pediatrics*, Jun; 99(6); p. 825
- BLASS, E.M. Y HOFFMEYER, L.B. (1991). Sucrose as an analgesic for newborn infants. *Pediatrics*, Feb; 87(2); p. 215-8
- BLOEDEL, J.R. Y BRACHA, V. (1995). On the cerebellum, cutaneomuscular reflexes, movement control and the elusive engrams of memory. *Behavioural brain research*, Apr; 68(1); p. 1-44
- BLUNDELL, J.E. Y LESHEM, M.B. (1974). Central action of anorexic agents: effects of amphetamine and fenfluramine in rats with lateral hypothalamic lesions. *Eur. J. Pharmacol.*, Sep; 28(1): 81-8
- BLUNDELL, J.E., LAWTON, C.L., COTTON, J.R. Y MACDIARMID, J.I. (1996). Control of human appetite: implications for the intake of dietary fat. *Annu. Rev. Nutr.*, 16: 285-319
- BOAKES, R.A., TARRIER, N., BARNES, B.W. Y TATTERSALL, M.H. (1993). Prevalence of anticipatory nausea and other side-effects in cancer patients receiving chemotherapy. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 29A(6); p. 866-70.
- BODNAR, R.J. Y KLEIN, G.E. (2004). Endogenous opiates and behavior: 2003. *Peptides*, Dec; 25(12): 2205-56

- BODNAR, R.J., GLASS, M.J. Y KOCH, J.E. (1995). Analysis of central opioid receptor subtype antagonism of hypotonic and hypertonic saline intake in water-deprived rats. *Brain Res. Bull.*, 36(3): 293-300
- BOOTH, D.A. Y BAKER, B.J. (1990). D1-fenfluramine challenge to nutrient-specific textural preference conditioned by concurrent presentation of two diets. *Behavioral neuroscience*, Feb; 104(1); p. 226-9
- BORISON, H.L. (1989). Area postrema: chemoreceptor circumventricular organ of the medulla oblongata. *Progress in neurobiology*, 32(5); p. 351-90
- BORSINI, F. Y ROLLS, E.T. (1984). Role of noradrenaline and serotonin in the basolateral region of the amygdala in food preferences and learned taste aversions in the rat. *Physiology & behavior*, Jul; 33(1); p. 37-43
- BOURGEAIS, L., GAURIAU, C. Y BERNARD, J.F. (2001). Projections from the nociceptive area of the central nucleus of the amygdala to the forebrain: a PHA-L study in the rat. *Eur. J. Neurosci.*, Jul; 14(2): 229-55
- BOUTHENET, M.L., SOUIL, E., MARTRES, M.P., SOKOLOFF, P., GIROS, B. Y SCHWARTZ, J.C. (1991). Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res.*, Nov 15; 564(2): 203-19.
- BOVETTO, S. Y RICHARD, D. (1995). Lesion of central nucleus of amygdala promotes fat gain without preventing effect of exercise on energy balance. *The American journal of physiology*, Oct; 269(4 Pt 2); p. R781-6
- BOX, B.M. Y MOGENSEN, G.J. (1975). Alterations in ingestive behaviors after bilateral lesions of the amygdala in the rat. *Physiology & behavior*, Dec; 15(6); p. 679-88
- BOZARTH, M.A. Y WISE, R.A. (1981). Intracranial self-administration of morphine into the ventral tegmental area in rats. *Life Sci.*, Feb 2; 28(5): 551-5
- BRACHA, V., IRWIN, K.B., WEBSTER, M.L., WUNDERLICH, D.A., STACHOWIAK, M.K. Y BLOEDEL, J.R. (1998). Microinjections of anisomycin into the intermediate cerebellum during learning affect the acquisition of classically conditioned responses in the rabbit. *Brain research*, Mar 30; 788(1-2); p. 169-78
- BRACHA, V., ZHAO, L., WUNDERLICH, D.A., MORRISSY, S.J. Y BLOEDEL, J.R. (1997). Patients with cerebellar lesions cannot acquire but are able to retain conditioned eyeblink reflexes. *Brain : a journal of neurology*, Aug; 120 (Pt 8); p. 1401-13
- BRADY, L.S. Y HOLTZMAN, S.G. (1981). Effects of intraventricular morphine and enkephalins on locomotor activity in nondependent, morphine-dependent and postdependent rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Sep; 218(3): 613-20
- BRAY, G.A. (2000). Afferent signals regulating food intake. *The Proceedings of the Nutrition Society*, Aug; 59(3); p. 373-84
- BRESLIN, P.A., SPECTOR, A. Y GRILL, H. (1992). A quantitative comparison of taste reactivity behaviors to sucrose before and after lithium chloride pairings: a unidimensional account of palatability. *Behavioral Neurosci.*, 106(5), 820-836.
- BRET DIBAT, J.L., BLUTHE, R.M., KENT, S., KELLEY, K.W. Y DANTZER, R. (1995). Lipopolysaccharide and interleukin-1 depress food-motivated behavior in mice by a vagal-mediated mechanism. *Brain Behav. Immun.*, Sep; 9(3): 242-6
- BRET DIBAT, J.L., CREMINON, C., COURAUD, J.Y., KELLEY, K.W., DANTZER, R. Y KENT, S. (1997). Systemic capsaicin pretreatment fails to block the decrease in food-motivated behavior induced by lipopolysaccharide and interleukin-1beta. *Brain Res. Bull.*, 42(6): 443-9
- BRODAL, A. (1981). *Neurological Anatomy in relation to clinical Medicine*, Oxford Univ. Press
- BROOKS, M.J. Y MELNIK, G. (1995). The refeeding syndrome: An approach to understanding its complications and preventing its occurrence. *Pharmacotherapy*, 15, 713-726
- BROWN, D.R. Y GOLDBERG, L.I. (1985). The use of quaternary narcotic antagonists in opiate research. *Neuropharmacology*, Mar; 24(3): 181-91
- BROWN, E.E. Y FIBIGER, H.C. (1993). Differential effects of excitotoxic lesions of the amygdala on cocaine-induced conditioned locomotion and conditioned place preference. *Psychopharmacology (Berl)*, 113(1): 123-30
- BUCY, P.C. Y KLÜVER, H. (1955). An anatomical investigation of the temporal lobe in the monkey (*Macaca mulatta*). *The Journal of comparative neurology*, Oct; 103(2); p. 151-251.
- BULLER, K.M., HAMLIN, A.S. Y OSBORNE, P.B. (2005). Dissection of peripheral and central endogenous opioid modulation of systemic interleukin-1beta responses using c-fos expression in the rat brain. *Neuropharmacology*, Aug; 49(2): 230-42

- BURES, J., BERMUDEZ-RATTONI, F. Y YAMAMOTO, T. (1998). *Conditioned Taste Aversion. Memory of special kind*, Oxford Science Publications.
- BURKEY, A.R., CARSTENS, E., WENNIGER, J.J., TANG, J. Y JASMIN, L. (1996). An opioidergic cortical antinociception triggering site in the agranular insular cortex of the rat that contributes to morphine antinociception. *J. Neurosci.*, Oct 15; 16(20): 6612-23.
- BURNS, L.H., ANNETT, L., KELLEY, A.E., EVERITT, B.J. Y ROBBINS, T.W. (1996). Effects of lesions to amygdala, ventral subiculum, medial prefrontal cortex, and nucleus accumbens on the reaction to novelty: implication for limbic-striatal interactions. *Behavioral neuroscience*, Feb; 110(1); p. 60-73.
- CAI, Y., HAY, M. AND BISHOP, V. (1994). Stimulation of the area postrema by vasopressin and ANG-II modulates neuronal activity in the NTS. *Brain Res.*, 647, 242-248.
- CALCAGNETTI, D.J. Y SCHECHTER, M.D. (1994). Nicotine Place Preference Using The Biased Method of Conditioning. *Progress Neuro. Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.*, Vol.18, 925-933.
- CALINGASAN, N.Y. Y RITTER, S. (1993). Lateral parabrachial subnucleus lesions abolish feeding induced by mercaptoacetate but not by 2-deoxy-D-glucose. *Am. J. Physiol.*, Nov; 265(5 Pt 2): R1168-78
- CALLAHAN, P.M., BRYAN, S.K. Y CUNNINGHAM, K.A. (1995). Discriminative stimulus effects of cocaine: antagonism by dopamine D1 receptor blockade in the amygdala. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Aug; 51(4): 759-66.
- CALVINO, B., LAGOWSKA, J. Y BEN-ARI, Y. (1979). Morphine withdrawal syndrome: differential participation of structures located within the amygdaloid complex and striatum of the rat. *Brain Res.*, Nov 9; 177(1): 19-34.
- CAMPEAU, S. Y DAVIS, M. (1995). Involvement of the central nucleus and basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. *J. Neurosci.*, 15(3 Pt 2): 2301-2311.
- CAMPEAU, S., MISERENDINO, M.J. Y DAVIS, M. (1992). Intra-amygdala infusion of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP<sup>5</sup> blocks acquisition but not expression of fear-potentiated startle to an auditory conditioned stimulus. *Behav. Neurosci.*, 106(3), 569-574.
- CANNON, C.M. Y PALMITER, R.D. (2003). Reward without dopamine. *The Journal of Neuroscience*, 23: 10827-10831.
- CANNON, D.S., BEST, M.R., BATSON, J.D. Y FELDMAN, M. (1983). Taste familiarity and apomorphine-induced taste aversions in humans. *Behaviour research and therapy*, 21(6); p. 669-73
- CANNON, D.S., BEST, M.R., BATSON, J.D., BROWN, E.R., RUBENSTEIN, J.A. Y CARRELL, L. (1985). Interfering with taste aversion learning in rats: the role of associative interference. *Appetite*, 6, 1-19.
- CANNON, C.M., ABDALLAH, L., TECOTT, L.H., DURING, M.J. Y PALMITER, R.D. (2004). Dysregulation of striatal dopamine signaling by amphetamine inhibits feeding by hungry mice. *Neuron*, Oct 28; 44(3): 509-20.
- CAPALDI, E.D., HUNTER, M.J. Y PRIVITERA, G.J. (2004). Odor of taste stimuli in conditioned "taste" aversion learning. *Behav. Neurosci.*, Dec; 118(6): 1400-8
- CARDINAL, R.N., WINSTANLEY, C.A., ROBBINS, T.W. Y EVERITT, B.J. (2004). Limbic corticostriatal systems and delayed reinforcement. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, Jun; 1021: 33-50.
- CARLSON, S.H., BEITZ, A. Y OSBORN, J.W. (1997). Intragastric hypertonic saline vasopressin and central Fos immunoreactivity in conscious rats. *Am. J. Physiol.*, 272(3-2): 750-758.
- CARLSON, S.H., COLLISTER, J.P. Y OSBORN, J.W. (1998). The area postrema modulates hypothalamic fos responses to intragastric hypertonic saline in conscious rats. *Am. J. Physiol.*, 275(6-2): 1921-1927.
- CARR, D.B., O'DONNELL, P., CARD, J.P. Y SESACK, S.R. (1999). Dopamine terminals in the rat prefrontal cortex synapse on pyramidal cells that project to the nucleus accumbens. *J. Neurosci.*, Dec 15; 19(24): 11049-60.
- CARR, G.D. Y WHITE, N.M. (1983). Conditioned place preference from intra-accumbens but not intra-caudate amphetamine injections. *Life Sci.*, Dec 19; 33(25): 2551-7.
- CARR, G.D. Y WHITE, N.M. (1986). Anatomical disassociation of amphetamine's rewarding and aversive effects: an intracranial microinjection study. *Psychopharmacology (Berl)*, 89(3): 340-6.
- CARR, K.D. (1996). Opioid receptor subtypes and stimulation-induced feeding. En: Cooper, S.J. and Clifton, P.G.: *Drug receptor subtypes and ingestive behavior*. Academic Press, pp. 167-191

- CARR, K.D. (2002). Augmentation of drug reward by chronic food restriction: behavioral evidence and underlying mechanisms. *Physiol Behav.*, 76 (3): 353-64
- CARR, K.D. Y KUTCHUKHIDZE, N. (2000). Chronic Food Restriction Increase Fos-Like Immunoreactivity (FLI) Induced in Rat Forebrain by Intraventricular Amphetamine. *Brain Research*, 861, 88-96.
- CARR, K.D. Y PAPADOUKA, V. (1994). The Role of Multiple Opioid Receptors in the Potentiation of Reward by Food Restriction. *Brain Research*, 639, 253-260.
- CARR, K.D. Y WOLINSKI, T.D. (1993). Chronic food restriction and weight loss produce opioid facilitation of perifornical hypothalamic self-stimulation. *Brain Research*, 607 (1-2): 142-148
- CARR, K.D., ALEMAN, D.O., BAK, T.H. Y SIMON, E.J. (1991). Effects of parabrachial opioid antagonism on stimulation-induced feeding. *Brain Res.*, Apr 5; 545(1-2): 283-6
- CARR, K.D., PARK, T.H., ZHANG, Y. Y STONE, E.A. (1998). Neuroanatomical patterns of Fos-like immunoreactivity induced by naltrexone in food-restricted and ad libitum fed rats. *Brain Res.*, Jan 1; 779(1-2): 26-32
- CARTER, D.A. Y MURPHY, D. (1990). Regulation of *c-fos* and *c-jun* expression in the rat supraoptic nucleus. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 10(3), 435-445.
- CASTONGUAY, T.W. Y BELLINGER, L.L. (1987). Capsaicin and its effects upon meal patterns, and glucagon and epinephrine suppression of food intake. *Physiology & behavior*, 40(3); p. 337-42
- CECHETTO, D.F. (1987). Central representation of visceral function. *Federation proceedings*, Jan; 46(1); p. 17-23
- CECHETTO, D.F. Y SAPER, C.B. (1987). Evidence for a viscerotopic sensory representation in the cortex and thalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, Aug 1; 262(1): 27-45.
- CHAMBERLIN, N.L., MANSOUR, A., WATSON, S.J. Y SAPER, C.B. (1999). Localization of mu-opioid receptors on amygdaloid projection neurons in the parabrachial nucleus of the rat. *Brain Res.*, May 8; 827(1-2): 198-204.
- CHAMBERS, K.C. (1990). A neural model for conditioned taste aversions. *Ann. Rev. of Neurosci.*, 13, 373-385.
- CHAVEZ, M., KELLY, L., YORK, D.A. Y BERTHOUD, H.R. (1997). Chemical lesion of visceral afferents causes transient overconsumption of unfamiliar high-fat diets in rats. *Am. J. Physiol.*, May; 272(5 Pt 2): R1657-63
- CHEN, G. Y STEINMETZ, J.E. (2000). Microinfusion of protein kinase inhibitor H7 into the cerebellum impairs the acquisition but not the retention of classical eyeblink conditioning in rabbits. *Brain research*, Feb 21; 856(1-2); p. 193-201
- CHEN, R.Z., HUANG, R.R., SHEN, C.P., MACNEIL, D.J. Y FONG, T.M. (2004). Synergistic effects of cannabinoid inverse agonist AM251 and opioid antagonist nalmefene on food intake in mice. *Brain Res.*, Mar 5; 999(2): 227-30
- CHENG, P.Y., MORIWAKI, A., WANG, J.B., UHL, G.R. Y PICKEL, V.M. (1996). Ultrastructural localization of mu-opioid receptors in the superficial layers of the rat cervical spinal cord: extrasynaptic localization and proximity to Leu5-enkephalin. *Brain Res.*, Aug 26; 731(1-2): 141-54.
- CHENG, C.Y., CHU, J.Y. Y CHOW, B.K. (2011). Central and peripheral administration of secretin inhibits food intake in mice through the activation of the melanocortin system. *Neuropsychopharmacology*, 36(2): 459-471.
- CHEVRETTE, J., STELLAR, J.R., HESSE, G.W. Y MARKOU, A. (2002). Both the shell of the nucleus accumbens and the central nucleus of the amygdala support amphetamine self-administration in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Mar; 71(3): 501-7.
- CHILDERS, S.R. (1997). Opioid receptors: pinning down the opiate targets. *Curr. Biol.*, Nov 1; 7(11): R695-7.
- CLAVIER, R.M. Y FIBIGER, H.C. (1977). On the role of ascending catecholaminergic projections in intracranial self-stimulation of the substantia nigra. *Brain. Res.*, Aug 12; 131(2): 271-86
- CLEARY, J., WELDON, D.T., O'HARE, E., BILLINGTON, C. Y LEVINE, A.S. (1996). Naloxone effects on sucrose-motivated behavior. *Psychopharmacology (Berl)*, Jul; 126(2): 110-4
- CLUGNET, M.C. Y LeDOUX, J.E. (1990). Synaptic plasticity in fear conditioning circuits: induction of LTP in the lateral nucleus of the amygdala by stimulation of the medial geniculate body. *J. Neurosci.*, 10(8), 2818-1824.

- COIL, J.D. Y NORRGREN, R. (1981). Taste aversions conditioned with intravenous copper sulphate: attenuation by ablation of the area postrema. *Brain Res.*, 212, 425-433.
- COIL, J.D., ROGERS, R.C., GARCIA, J. Y NOVIN, D. (1978). Conditioned taste aversions: vagal and circulatory mediation of the toxic unconditioned stimulus. *Behav. Biol.*, 24(4), 509-19.
- COLANTUONI, C., SCHWENKER, J., MCCARTHY, J., RADA, P., LADENHEIM, B., CADET, J.L., SCHWARTZ, G.J., MORAN, T.H. Y HOEBEL, B.G. (2001). Excessive sugar intake alters binding to dopamine and mu-opioid receptors in the brain. *Neuroreport*, Nov 16; 12(16): 3549-52
- COLE, S.O. (1974). Changes in the feeding behavior of rats after amygdala lesions. *Behavioral biology*, Oct; 12(2); p. 265-70
- COLE, S.O. (1983). Combined effects of chlordiazepoxide treatment and food deprivation on concurrent measures of feeding and activity. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Mar; 18(3): 369-72
- CONTARINO, A., DRAGO, F., ZANOTTI, A., NATOLINO, F., BERTI, T. Y GIUSTI, P. (1999). A new place conditioning paradigm to study tolerance to opiates in mice. *Neuroreport*, Feb 25; 10(3): 517-21.
- CONTRERAS, R.J., GOMEZ, M.M. Y NORRGREN, R. (1980). Central origins of cranial nerve parasympathetic neurons in the rat. *J. Comp. Neurol.*, Mar 15; 190(2): 373-94
- COOPER, S.J. (1980). Naloxone: effects on food and water consumption in the non-deprived and deprived rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 71 (1); p. 1-6
- COOPER, S.J. (1983). Benzodiazepine-opiate antagonist interactions and reward processes: implications for drug dependency. *Neuropharmacology*, Apr; 22(4): 535-8
- COTA, D., TSCHOP, M.H., HORVATH, T.L. Y LEVINE, A.S. (2006). Cannabinoids, opioids and eating behavior: the molecular face of hedonism? *Brain Res. Rev.*, Jun; 51(1): 85-107
- Cousens, G.A., Kearns, A., Laterza, F. Y Tundidor, J. (2012). Excitotoxic lesions of the medial amygdala attenuate olfactory fear-potentiated startle and conditioned freezing behavior. *Behavioural Brain Research*, April 15; 229(2): 427-432
- COUSENS, G. Y OTTO, T. (1998). Both pre- and posttraining excitotoxic lesions of the basolateral amygdala abolish the expression of olfactory and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.*, 112(5), 1092-1103.
- COVASA, M. Y FORBES, J.M. (1995). Selection of foods by broiler chickens following corticosterone administration. *British poultry science*, Jul; 36(3); p. 489-501.
- CRiado, J.R. Y MORALES, M. (2000). Acute ethanol induction of c-Fos immunoreactivity in pre-pro-enkephalin expressing neurons of the central nucleus of the amygdala. *Brain Res.*, Apr 7; 861(1): 173-7.
- CRIPPENS, D. Y ROBINSON, T.E. (1994). Withdrawal from morphine or amphetamine: different effects on dopamine in the ventral-medial striatum studied with microdialysis. *Brain Res.*, Jul 4; 650(1): 56-62
- CROW, T.J. Y WHITAKER, I.M. (1970). A short-term effect of amygdaloid lesions on food intake in the rat. *Experimental neurology*, Jun; 27(3); p. 520-6.
- CUBERO, I. (1995). Análisis funcional del eje cortico-parabraquial en el aprendizaje gustativo. *Tesis Doctoral*, Universidad de Granada.
- CUBERO, I. Y PUERTO, A. (2000a). Lateral parabrachial lesions impair intraperitoneal but not intraventricular methylscopolamine-induced taste aversion learning. *Brain research*, Jul 14; 871(1); p. 113-9
- CUBERO, I. Y PUERTO, A. (2000b). Electrical Stimulation of the Insular Cortex induces flavor-preferences in rats. *Brain Research*, 872, 134-140.
- CUBERO, I., LÓPEZ, M., NAVARRO, M. Y PUERTO, A. (2001). Lateral parabrachial lesions impair taste aversion learning induced by blood-borne visceral stimuli. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 69(1-2), 157-163.
- CURTIS, K.S. Y STRICKER, E.M. (1997). Enhanced fluid intake by rats after capsaicin treatment. *Am. J. Physiol.*, Feb; 272(2 Pt 2): R704-9
- DACEY, D.M. Y GROSSMAN, S.P. (1977). Aphagia, adipsia, and sensory-motor deficits produced by amygdala lesions: a function of extra-amygdaloid damage. *Physiology & behavior*, Sep; 19(3); p. 389-95
- D'ANCI, K.E., KANAREK, R.B. Y MARKS-KAUFMAN, R. (1996). Duration of sucrose availability differentially alters morphine-induced analgesia in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, Aug; 54(4); p. 693-7

- DANTZER, R., KONSMAN, J.P., BLUTHE, R.M. Y KELLEY, K.W. (2000). Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton. Neurosci.*, Dec 20; 85(1-3): 60-5
- DATE, Y., MURAKAMI, N., TOSHINAI, K., MATSUKURA, S., NIIJIMA, A., MATSUO, H., KANGAWA, K. Y NAKAZATO, M. (2002). The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*, Oct; 123(4): 1120-8
- DAVIDSON, T.L. (1993). The nature and function of interoceptive signals to feed: toward integration of physiological and learning perspectives. *Psycholog. Rev.*, 11(4), 640-657.
- DAVIS, J.D. Y CAMPBELL, C.S. (1973). Peripheral control of meal size in the rat. Effect of sham feeding on meal size and drinking rate. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, Jun; 83(3): 379-87
- DAVIS, J.D. Y LEVINE, M.W. (1977). A model for the control of ingestion. *Psychol. Rev.*, Jul; 84(4): 379-412.
- DAVIS, J.D., SMITH, G.P. Y KUNG, T.M. (1994). Abdominal vagotomy alters the structure of the ingestive behavior of rats ingesting liquid diets. *Behav. Neurosci.*, Aug; 108(4): 767-79
- DAVIS, M. (1992). The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu. Rev. Neurosci.*, 15, 353-375.
- DAVIS, M., FALLS, W.A., CAMPEAU, S. Y KIM, M. (1993). Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behav. Brain Res.*, 58(1-2), 175-198.
- DE ARAUJO, I.E., ROLLS, E.T., KRINGELBACH, M.L., MCGLONE, F. Y PHILLIPS, N. (2003). Taste-olfactory convergence, and the representation of the pleasantness of flavour, in the human brain. *Eur. J. Neurosci.*, Oct; 18(7): 2059-68
- DE GOBBI, J.I., DE LUCA, L.A. JR., JOHNSON, A.K. Y MENANI, J.V. (2001). Interaction of serotonin and cholecystokinin in the lateral parabrachial nucleus to control sodium intake. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, May; 280(5): R1301-7
- DE GOBBI, J.I., BELTZ, T.G., JOHNSON, R.F., MENANI, J.V., THUNHORST, R.L. Y JOHNSON, A.K. (2009). Non-NMDA receptors in the lateral parabrachial nucleus on sodium appetite. *Brain Research*, 1301, 44-51
- DE LACALLE, S. Y SAPER, C.B. (2000). Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity marks putative visceral sensory pathways in human brain. *Neuroscience*, 100(1); p. 115-30
- DE OLMOS, J.S. (1990). Amygdala. En Paxinos, G. (Eds.), *The Human Nervous System*, Academic Press, 583-710.
- DEL POZO, E., BARRIOS, M. Y BAEYENS, J.M. (1996). The NMDA receptor antagonist dizocilpine (MK-801) stereoselectively inhibits morphine-induced place preference conditioning in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, Jun; 125(3): 209-13.
- DELAMETER, A.R., SCLAFANI, A. Y BODNAR, R. (2000). Pharmacology of sucrose-reinforced place-preference conditioning: Effects of Naltrexona. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 65 (4): 697-704.
- DELFS, J.M., ZHU, Y., DRUHAN, J.P. Y ASTON-JONES, G. (2000). Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-induced aversion. *Nature*, Jan 27; 403(6768): 430-4.
- DEUTSCH, J.A. (1985). The role of the stomach in eating. *Am. J. Clin. Nutr.*, Nov; 42(5 Suppl): 1040-3
- DEUTSCH, J.A. (1990). Food intake: Gastric factors. En Stricker, E.M. (Ed.). *Handbook of behavioral neurobiology*, 10; New York: Plenum Press., 151-182.
- DEUTSCH, J.A., THIEL, T.R. Y GREENBERG, L.H. (1978). Duodenal motility after cholecystokinin injection or satiety. *Behavioral biology*, Nov; 24(3); p. 393-9
- DEUTSCH, J.A., MOLINA, F. Y PUERTO, A. (1976). A conditioned taste aversion causes by palatable nontoxic nutrients. *Behav. Biol.*, 16, 161-174.
- DI CHIARA, G. (1998). A Motivational Learning Hypothesis of the Role of Mesolimbic Dopamine in Compulsive Drug Use. *J. of Psychopharmacol.*, 12 (1), 54-67.
- DI CHIARA, G. Y IMPERATO, A. (1988). Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Mar; 244(3): 1067-80.
- DI CHIARA, G. Y NORTH, A. (1992). Neurobiology of Opiate Abuse. *Trends in Pharmacological Sciences*, Vol.13,185-192.



- DI, S., MALCHER-LOPES, R., HALMOS, K.C. Y TASKER, J.G. (2003). Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J. Neurosci.*, Jun 15; 23(12): 4850-7
- DÍAZ, J., LÉVESQUE, D., LAMMERS, C.H., GRIFFON, N., MARTRES, M.P., SCHWARTZ, J.C. Y SOKOLOFF, P. (1995). Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience*, Apr; 65(3): 731-45.
- DÍAZ, J., PILON, C., LE FOLL, B., GROS, C., TRILLER, A., SCHWARTZ, J.C. Y SOKOLOFF, P. (2000). Dopamine D3 receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons. *J. Neurosci.*, Dec 1; 20(23): 8677-84.
- DING, Y.Q., KANEKO, T., NOMURA, S. Y MIZUNO, N. (1996). Immunohistochemical localization of mu-opioid receptors in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.*, Apr 8; 367(3): 375-402
- DOYLE, T.G., BERRIDGE, K.C. Y GOSNELL, B.A. (1993). Morphine enhances hedonic taste palatability in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Nov; 46(3): 745-9
- DRAGUNOW, M. Y FAULL, R. (1989). The use of *c-fos* as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *Journal of Neurosci. Methods*, 29, 261-265.
- DROWER, E.J., STAPELFELD, A., RAFFERTY, M.F., DE-COSTA, B.R., RICE, K.C. Y HAMMOND, D.L. (1991). Selective antagonism by naltrindole of the antinociceptive effects of the delta opioid agonist cyclic[D-penicillamine2-D-penicillamine5]enkephalin in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Nov; 259(2): 725-31.
- DUARTE, C., LEFEBVRE, C., CHAPERON, F., HAMON, M. Y THIEBOT, M.H. (2003). Effects of a dopamine D3 receptor ligand, BP 897, on acquisition and expression of food-, morphine-, and cocaine-induced conditioned place preference, and food-seeking behavior in rats. *Neuropsychopharmacology*, 28(11): 1903-15
- DUNN, L.T. Y EVERITT, B.J. (1988). Double dissociations of the effects of amygdala and insular cortex lesions on conditioned taste aversion, passive avoidance, and neophobia in the rat using the excitotoxin ibotenic acid. *Behav. Neurosci.*, 102(1), 3-23
- DURLACH, P.J. Y RESCORLA, R.A. (1980). Potentiation rather than overshadowing in flavor-aversion learning: an analysis in terms of within-compound associations. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.*, 6(2), 175-187.
- EASTERLING, K.W. Y HOLTZMAN, S.G. (2004). In rats, acute morphine dependence results in antagonist-induced response suppression of intracranial self-stimulation. *Psychopharmacology (Berl)*, Sep; 175(3): 287-95.
- EDWARDS, G.L. Y JOHNSON, A.K. (1991). Enhanced drinking after excitotoxic lesions of the parabrachial nucleus in the rat. *Am. J. Physiol.*, Oct; 261(4 Pt 2): R1039-44
- EDWARDS, G.L. Y RITTER, R.C. (1989). Lateral parabrachial lesions attenuate ingestive effects of area postrema lesions. *Am. J. Physiol.*, 256; 2; Pt 2; R306-12
- EICHENBAUM, H., FAGAN, A. Y COHEN, N.J. (1986). Normal olfactory discrimination learning set and facilitation of reversal learning after medial-temporal damage in rats: implications for an account of preserved learning abilities in amnesia. *J. Neurosci.*, 6(7), 1876-1884.
- EICHENBAUM, H., MATHEWS, P. Y COHEN, N.J. (1989). Further studies of hippocampal representation during odor discrimination learning. *Behav. Neurosci.*, 103(6), 1207-1216.
- ELIAS, C.F., KELLY, J.F., LEE, C.E., AHIMA, R.S., DRUCKER, D.J., SAPER, C.B. Y ELMQUIST, J.K. (2000). Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, Jul 24; 423(2): 261-81.
- ELMQUIST, J.K., AHIMA, R.S., MARATOS FLIER, E., FLIER, J.S. Y SAPER, C.B. (1997). Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. *Endocrinology*, Feb; 138(2): 839-42
- ELMQUIST, J.K., BJORBAEK, C., AHIMA, R.S., FLIER, J.S. Y SAPER, C.B. (1998). Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, Jun 15; 395(4): 535-47
- EMOND, M., SCHWARTZ, G.J. Y MORAN, T.H. (2001). Meal-related stimuli differentially induce c-Fos activation in the nucleus of the solitary tract. *Am. J. Physiol. Integrative Regulatory Comp. Physiol.*, 280(5): R1315-R1321
- ERVIN, F.R., PALMOUR, R.M., YOUNG, S.N., GUZMAN-FLORES, C. Y JUAREZ, J. (1990). Voluntary consumption of beverage alcohol by vervet monkeys: population screening, descriptive behavior and biochemical measures. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 36(2), 367-373.

- ESPÓSITO, R.U., PERRY, W. Y KORNETSKY, C. (1980). Effects of d-amphetamine and naloxone on brain stimulation reward. *Psychopharmacology (Berl)*, 69(2): 187-91.
- ESPÓSITO, R.U., PERRY, W. Y KORNETSKY, C. (1981). Chlorpromazine and brain-stimulation reward: potentiation of effects by naloxone. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Dec; 15(6): 903-5.
- ETTENBERG, A., PETTIT, H.O., BLOOM, F.E. Y KOOB, G.F. (1982). Heroin and Cocaine intravenous self-administration in rats: Mediation by separate neural systems. *Psychopharmacology*, 78, 204-209.
- EVERITT, B.J. Y ROBBINS, T.W. (2000). Second-order schedules of drug reinforcement in rats and monkeys: measurement of reinforcing efficacy and drug-seeking behaviour. *Psychopharmacology (Berl)*, Dec; 153(1): 17-30.
- EVERITT, B.J., CARDINAL, R.N., PARKINSON, J.A. Y ROBBINS, T.W. (2003). Appetitive behavior: impact of amygdala-dependent mechanisms of emotional learning. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, Apr; 985: 233-50.
- EVERITT, B.J., MORRIS, K.A., O'BRIEN, A. Y ROBBINS, T.W. (1991). The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes. *Neuroscience*, 42(1): 1-18.
- FALLON, J.H. Y LESLIE, F.M. (1986). Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, Jul 15; 249(3): 293-336
- FANSELOW, M.S. Y KIM, J.J. (1994). Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. *Behav. Neurosci.*, 108(1), 210-212.
- FERNÁNDEZ-ESPEJO, E. (2002). Bases neurobiológicas de la drogadicción. *Revista de Neurología*, 34 (7), 659-664.
- FERRARO, F.M. 3RD., HILL, K.G., KACZMAREK, H.J., COONFIELD, D.L. Y KIEFER, S.W. (2002). Naltrexone modifies the palatability of basic tastes and alcohol in outbred male rats. *Alcohol*, Jun; 27(2): 107-14
- FERRY, B. Y DI SCALA, G. (1997). Bicuculline administration into basolateral amygdala facilitates trace conditioning of odor aversion in the rat. *Neurobiol. of Learn. and Mem.*, 67(1), 80-83.
- FERRY, B. Y DI SCALA, G. (2000). Basolateral amygdala NMDA receptors are selectively involved in the acquisition of taste-potentiated odor aversion in the rat. *Behav. Neurosci.*, 114(5), 1005-1010.
- FERRY, B., SANDNER, G. Y Di SCALA, G. (1995). Neuroanatomical and functional specificity of the basolateral amygdaloid nucleus in taste-potentiated odor aversion. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 64(2): 169-180.
- FERRY, B., WIRTH, S. Y Di SCALA, G. (1999). Functional interaction between entorhinal cortex and basolateral amygdala during trace conditioning of odor aversion in the rat. *Behav. Neurosci.*, 113(1), 118-25.
- FILIZOLA, M., HARRIS, D.L. Y LOEW, G.H. (2000). Benzodiazepine-induced hyperphagia: development and assessment of a 3D pharmacophore by computational methods. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, Apr; 17(5): 769-78.
- FINGER, T.H. Y MORITA, Y. (1985). Two gustatory systems: Facial and vagal gustatory nuclei have different brainstem connections. *Science*, 227, 776-778.
- FINLEY, J.C., MADERDRUT, J.L. Y PETRUSZ, P. (1981). The immunocytochemical localization of enkephalin in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.*, Jun 1; 198(4): 541-65
- FITZGERALD, R.E. Y BURTON, M. (1983). Effects of small basolateral amigdala lesions on ingestion in the rats. *Physiol. and Behav.*, 27, 431-437.
- FLIER, J.S. (2004). Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*, Jan 23; 116(2): 337-50
- FLORES, C., ARVANTOGIANNIS, A. Y SHIZGAL, P. (1997). Fos-like immunoreactivity in forebrain regions following self-stimulation of the lateral hypothalamus and the ventral tegmental area. *Behavioural brain research*, Sep; 87(2); p. 239-51
- FONBERG, E. (1969). The role of the hypothalamus and amygdala in food intake, alimentary motivation and emotional reactions. *Acta biologiae experimentalis*, 29(3); p. 335-58
- FONBERG, E. (1971). Hyperphagia produced by lateral amygdalar lesions in dogs. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 31(1); p. 19-32
- FONBERG, E. (1973). The normalizing effect of lateral amygdalar lesions upon the dorsomedial amygdalar syndrome in dogs. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 33(2); p. 449-66

FOX, R.A., CORCORAN, M. Y BRIZZEE, K.R. (1990). Conditioned taste aversion and motion sickness in cats and squirrel monkeys. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, Feb; 68(2); p. 269-78.

FRANCÈS, H., LE FOLL, B., DÍAZ, J., SMIRNOVA, M. Y SOKOLOFF, P. (2004a). Role of DRD3 in morphine-induced conditioned place preference using drd3-knockout mice. *Neuroreport*, Oct 5; 15(14): 2245-9.

FRANCÈS, H., SMIRNOVA, M., LERICHE, L. Y SOKOLOFF, P. (2004b). Dopamine D3 receptor ligands modulate the acquisition of morphine-conditioned place preference. *Psychopharmacology (Berl)*, 175(2): 127-33.

FRANKLIN, K.B. Y ROBERTSON, A. (1980). 5HT blockade and the stimulant effects of D- and L-amphetamine: no interaction in self-stimulation of prefrontal cortex, hypothalamus, or dorsal tegmentum. unexpected lethality in hippocampal sites. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 13(3): 365-70.

FRANKLIN, K.B.J. Y VACCARINO, F.J. (1983). Differential effects of amphetamine isomers on SN self-stimulation: evidence for DA neuron subtypes. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 18: 747-751.

FREEDMAN, N.L. Y PANGBORN, D. (1984). Site-specific naloxone blockade of brain self-stimulation duration. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, Mar; 20(3): 361-6.

FRENOIS, F., CADOR, M., CAILLE, S., STINUS, L. Y LE MOINE, C. (2002). Neural correlates of the motivational and somatic components of naloxone-precipitated morphine withdrawal. *Eur. J. Neurosci.*, Oct; 16(7): 1377-89.

FREY, S., MORRIS, R. Y PETRIDES, M. (1997). A neuroanatomical method to assess the integrity of fibers of passage following ibotenate-induced damage to the central nervous system. *Neurosci. Res.*, 28(3), 285-288.

FRIEDMAN, M. (1991). Formation, nutritional value, and safety of D-amino acids. *Advances in experimental medicine and biology*, 289; p. 447-81.

FRISINA, P.G. Y SCLAFANI, A. (2002). Naltrexone suppresses the late but not early licking response to a palatable sweet solution: opioid hedonic hypothesis reconsidered. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, Dec; 74(1): 163-72

FUJIMOTO, K., IKEGUCHI, K. Y YOSHIDA, M. (1990). Decrease and recovery of choline acetyltransferase activity in medial thalamus and ventral tegmental area after destruction of pedunculo pontine nucleus areas in the rat. *Neuroscience research*, Sep; 9(1); p. 48-53

FULWILER, C.E. Y SAPER, C.B. (1984). Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res.*, Aug; 319(3): 229-59

FURNESS, J.B., KOOPMANS, H.S., ROBBINS, H.L., CLERC, N., TOBIN, J.M. Y MORRIS, M.J. (2001). Effects of vagal and splanchnic section on food intake, weight, serum leptin and hypothalamic neuropeptide Y in rat. *Auton. Neurosci.*, Sep 17; 92(1-2): 28-36

GALAVERNA, O.G., SEELEY, R.J., BERRIDGE, K.C., GRILL, H.J., EPSTEIN, A.N. Y SCHULKIN, J. (1993). Lesions of the central nucleus of the amygdala. I: Effects on taste reactivity, taste aversion learning and sodium appetite. *Behav. Brain Res.*, 59(1-2), 11-17.

GALEF, B.G. (1995). Food selection: Problems in understanding how we choose foods to eat. *Neuroscience and Biobehavioural Reviews*, 20, 67-73

GALEF, B.G. Y WRIGHT, T.J. (1995). Groups of naïve rats learn to select nutritionally adequate foods faster than do isolated naïve rats. *Animal Behavior*, 49, 403-409

GALEF, B.G., WISHKIN, E.E. Y BIELAVSKA, E. (1997). Interaction with demonstrator rats changes observer rats' affective responses to flavors. *Journal of Comparative Psychology*, 111, 393-398

GALLAGHER, M. Y HOLLAND, P.C. (1992). Preserved configural learning and spatial learning impairment in rats with hippocampal damage. *Hippocampus*, Jan; 2(1): 81-8.

GALLISTEL, C.R., LEON, M., LIM, B.T., SIM, J.C. Y WARACZYNSKI, M. (1996). Destruction of the Medial Forebrain Bundle Caudal to the Site of Stimulation Reduces Rewarding Efficacy but Destruction Rostrally Does Not. *Beh. Neurosci.*, 110 (4), 766-790.

GALLO, M. Y PUERTO, A. (1986). Efectos diferenciales de las lesiones del área postrema durante el aprendizaje interoceptivo inducido por rotación. *Revista de Psicología General y Aplicada*, 41(3), 495-503.

GALLO, M., ARNEDO, M., AGÜERO, A. Y PUERTO, A. (1988). Electrical intracerebral stimulation of the area postrema in taste aversion learning. *Behav. Brain Res.*, 30, 289-296.

GALLO, M., ARNEDO, M., AGÜERO, A. Y PUERTO, A. (1990). The functional relevance of the area postrema in drug induced aversion learning. *Pharmacol., Biochem. & Behav.*, 35, 543-551.

- GALLO, M., ARNEDO, M., AGÜERO, A. Y PUERTO, A. (1991). Participation of the area postrema in learned aversions induced by body rotation. *Behav. Brain Res.*, 42(1), 13-23.
- GALLO, M., BIELAVSKA, E., ROLDAN, G. Y BURES, J. (1998). Tetrodotoxin inactivation of the gustatory cortex disrupts the effect of the N-methyl-D-aspartate antagonist ketamine on latent inhibition of conditioned taste aversion rats. *Neurosci. Letters*, 240(2), 61-64.
- GALLO, M., ROLDAN, G. Y BURES, J. (1992). Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behav-Brain-Res.*, 52(1), 91-7.
- GANARAJ, B. Y JEGANATHAN, P.S. (1998). Involvement of basolateral nucleus & central nucleus of amygdala in the regulation of ingestive behaviour in rat. *The Indian journal of medical research*, Sep; 108; p. 98-103
- GARB, J.L. Y STUNKARD, A.J. (1974). Taste aversions in man. *The American journal of psychiatry*, Nov; 131(11); p. 1204-7
- GARCIA, J. (1990). Learning without memory. *J. of Cognitive Neurosci.*, 2(4), 287-305.
- GARCIA, J., KIMALDORF, D.J. Y KOLLING, R.A. (1955). Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science*, 122, 157-158.
- GARCIA, J., ERVIN, F. Y KOELLING, R.A. (1966). Learning with prolonged delay of reinforcement. *Psychonom. Sci.*, 5, 121-122.
- GARCIA, J., MCGOWAN, B.K., ERVIN, F.R. AND KOELLING, R.A. (1968). Cues: their relative effectiveness as a function of the reinforcer. *Science*, 160(829), 794-5.
- GARCIA, J., LASITER, P., BERMUDEZ-RATTONI, F. Y DEEMS, D. (1985). A general theory of aversion learning. En: Braveman Eds., *Experimental assessments and clinical implications of conditioned food aversions*, Ann. of N.Y. Acad. of Sci., vol. 443, 8-22
- GARRIS, P. A., KILPATRICK, M., BUNIN, M. A., MICHAEL, D., WALKER, D. Y WIGHTMAN, R. M. (1999). Dissociation of dopamine release in the Nucleus Accumbens from intracranial self-stimulation. *Nature*, 398, 67-69.
- GELLERT, V.F. Y SPARBER, S.B. (1977). A comparison of the effects of naloxone upon body weight loss and suppression of fixed-ratio operant behavior in morphine-dependent rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Apr; 201(1): 44-54
- GEORGES, F. Y ASTON-JONES, G. (2002). Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the stria terminalis: a novel excitatory amino acid input to midbrain dopamine neurons. *J. Neurosci.*, Jun 15; 22(12): 5173-87
- GEORGES, F., STINUS, L. Y LE MOINE, C. (2000). Mapping of c-fos gene expression in the brain during morphine dependence and precipitated withdrawal, and phenotypic identification of the striatal neurons involved. *The European journal of neuroscience*, Dec; 12(12); p. 4475-86
- GESTREAU, C., LE GUEN, S. Y BESSON, J.M. (2000). Is there tonic activity in the endogenous opioid systems? A c-Fos study in the rat central nervous system after intravenous injection of naloxone or naloxone-methiodide. *J. Comp. Neurol.*, Nov 13; 427(2): 285-301.
- GEURDEN, I., CUVIER, A., GONDOUIN, E., OLSEN, R.E., RUOHONEN, K., KAUSHIK, S. Y BOUJARD, T. (2005). Rainbow trout can discriminate between feeds with different oil sources. *Physiology & behavior*, Jun 2; 85(2); p. 107-14
- GIEROBA, Z.J. Y BLESSING, W.W. (1994). Fos-containing neurons in medulla and pons after unilateral stimulation of the afferent abdominal vagus in conscious rabbits. *Neuroscience*, Apr; 59(4); p. 851-8
- GIRAUDO, S.Q., BILLINGTON, C.J. Y LEVINE, A.S. (1998). Effects of the opioid antagonist naltrexone on feeding induced by DAMGO in the central nucleus of the amygdala and in the paraventricular nucleus in the rat. *Brain Res.*, Jan 26; 782(1-2): 18-23
- GLASS, M.J., BILLINGTON, C.J. Y LEVINE, A.S. (2000). Naltrexone administered to central nucleus of amygdala or PVN: neural dissociation of diet and energy. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, Jul; 279(1): R86-92
- GLASS, M.J., GRACE, M., CLEARY, J.P., BILLINGTON, C.J. Y LEVINE, A.S. (1996). Potency of naloxone's anorectic effect in rats is dependent on diet preference. *Am. J. Physiol.*, Jul; 271(1 Pt 2): R217-21
- GLASS, M.J., GRACE, M.K., CLEARY, J.P., BILLINGTON, C.J. Y LEVINE, A.S. (2001). Naloxone's effect on meal microstructure of sucrose and cornstarch diets. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, Nov; 281(5): R1605-12.

- GLASS, M.J., O'HARE, E., CLEARY, J.P., BILLINGTON, C.J. Y LEVINE, A.S. (1999a). The effect of naloxone on food-motivated behavior in the obese Zucker rat. *Psychopharmacology*, Feb; 141(4); p. 378-84
- GLASS, M.J., BILLINGTON, C.J. Y LEVINE, A.S. (1999b). Opioids and food intake: distributed functional neural pathways? *Neuropeptides*, Oct; 33(5): 360-8
- GOEHLER, L.E., GAYKEMA, R.P., HANSEN, M.K., ANDERSON, K., MAIER, S.F. Y WATKINS, L.R. (2000). Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. *Auton. Neurosci.*, Dec 20; 85(1-3): 49-59
- GONZÁLEZ, M.F. Y DEUTSCH, J.A. (1981). Vagotomy abolishes cues of satiety produced by gastric distension. *Science*, Jun 12; 212(4500): 1283-4
- GOTTFRIED, J.A., O'DOHERTY, J. Y DOLAN, R.J. (2003). Encoding predictive reward value in human amygdala and orbitofrontal cortex. *Science*, Aug 22; 301(5636): 1104-7.
- GRACY, K.N., DANKIEWICZ, L.A. Y KOOB, G.F. (2001). Opiate withdrawal-induced fos immunoreactivity in the rat extended amygdala parallels the development of conditioned place aversion. *Neuropsychopharmacology*, Feb; 24(2): 152-60.
- GRAKALIC, I. Y RILEY, A.L. (2002). Etanol preexposure attenuates the interaction of ethanol and cocaine in taste aversion learning. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 72(3), 633-641.
- GRIGSON, P.S., REILLY, S., SHIMURA, T. Y NORNGREN, R. (1998a). Ibotenic acid lesions of the parabrachial nucleus and conditioned taste aversion: further evidence for an associative deficit in rats. *Behav-Neurosci.*, Feb; 112(1): 160-71
- GRIGSON, P.S., REILLY, S., SCALERA, G. Y NORNGREN, R. (1998b). The parabrachial nucleus is essential for acquisition of a conditioned odor aversion in rats. *Behav. Neurosci.*, Oct; 112(5): 1104-13
- GRILL, H.J. Y KAPLAN, J.M. (2002). The neuroanatomical axis for control of energy balance. *Front-Neuroendocrinol.*, Jan; 23(1): 2-40
- GRILL, H. Y NORNGREN, R. (1978). The taste reactivity test: II. Mimetical responses to gustatory stimuli in chronic thalamic and chronic decerebrate rats. *Brain Res.*, 143, 281-297.
- GRILL, H.J., DONAHEY, J.C., KING, L. Y KAPLAN, J.M. (1997). Contribution of caudal brainstem to d-fenfluramine anorexia. *Psychopharmacology (Berl)*, Apr; 130(4): 375-81
- GRILL, H.J., FRIEDMAN, M.I., NORNGREN, R., SCALERA, G. Y SEELEY, R. (1995). Parabrachial nucleus lesions impair feeding response elicited by 2,5-anhydro-D-mannitol. *Am. J. Physiol.*, Mar; 268(3 Pt 2): R676-82
- GROSSMAN, S.P. Y GROSSMAN, L. (1963). Food and water intake following lesions or electrical stimulation of the amygdala. *The American journal of physiology*, Oct; 205; p. 761-5
- GU, Y., GONZÁLEZ, M.F., CHIN, D.Y. Y DEUTSCH, J.A. (1993). Expresión of *c-fos* in brain subcortical structures in response to nauseant lithium chloride and osmotic pressure in rats. *Neurosci. Letters*, 157(1), 49-52
- GUAN, L., EISENSTEIN, T.K., ADLER, M.W. Y ROGERS, T.J. (1997). Inhibition of T cell superantigen responses following treatment with the kappa-opioid agonist U50,488H. *J.Neuroimmunol.*, May; 75(1-2): 163-8.
- GULATI, K. Y RAY, A. (1995). Effects of intrahypothalamic morphine and its interactions with oxytocin and vasopressin during food intake in rats. *Brain Res.*, Aug 28; 690(1): 99-103
- GUSTAVSON, C.R., KELLY, D.J. Y SWEENEY, M. (1976). Prey-lithium aversions. I: coyotes and wolves. *Behavioral biology*, May; 17(1); p. 61-72
- GUTSTEIN, H.B., THOME, J.L., FINE, J.L., WATSON, S.J. Y AKIL, H. (1998). Pattern of *c-fos* mRNA induction in rat brain by acute morphine. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, Mar; 76(3); p. 294.
- HALSELL, C.B. (1992). Organization of parabrachial nucleus efferents to the thalamus and amygdala in the golden hamster. *J. Comp. Neurol.*, Mar 1; 317(1): 57-78.
- HALSELL, C.B. Y FRANK, M.E. (1992). Organization of taste-evoked activity in the hamster parabrachial nucleus. *Brain research*, Feb 14; 572(1-2); p. 286-90
- HALSELL, C.B. Y TRAVERS, S.P. (1997). Anterior and posterior oral cavity responsive neurons are differentially distributed among parabrachial subnuclei in rat. *Journal of neurophysiology*, Aug; 78(2); p. 920-38
- HAMAMURA, M., OZAWA, H., KIMURO, Y., OKOUCHI, J., HIGASA, K., IWAKI, A. Y FUKUMAKI, Y. (1999). Differential decreases in *c-fos* and aldolase C mRNA expression in the rat cerebellum after repeated administration of methamphetamine. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 22; 64(1), 119-31.

- HAMLIN, A., BULLER, K.M., DAY, T.A. Y OSBORNE, P.B. (2001). Peripheral withdrawal recruits distinct central nuclei in morphine-dependent rats. *Neuropharmacology*, Oct; 41(5); p. 574-81
- HAMLIN, A.S., BULLER, K.M., DAY, T.A. Y OSBORNE, P.B. (2004). Effect of naloxone-precipitated morphine withdrawal on *c-fos* expression in rat corticotropin-releasing hormone neurons in the paraventricular hypothalamus and extended amygdala. *Neuroscience letters*, May 13; 362(1); p. 39-43
- HAND T.H. Y FRANKLIN T.H. (1983). The influence of amphetamine on preference for lateral hypothalamic versus prefrontal cortex of ventral tegmental area self-stimulation. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 18: 696-699.
- HARRIS, G.C. Y ASTON-JONES, G. (1994). Involvement of D2 dopamine receptors in the nucleus accumbens in the opiate withdrawal syndrome. *Nature*, Sep 8; 371(6493): 155-7
- HARRIS, L.J., CLAY, J., HARGREAVES, F.J. Y WARD, A. (1933). Appetite and choice of diet: The ability of the vitamin B deficient rat to discriminate between diets containing and lacking the vitamin. *Proceedings of the Royal Society of London (B)*, 113, 161-190
- HARROLD, J.A., ELLIOTT, J.C., KING, P.J., WIDDOWSON, P.S. Y WILLIAMS, G. (2002). Down-regulation of cannabinoid-1 (CB-1) receptors in specific extrahypothalamic regions of rats with dietary obesity: a role for endogenous cannabinoids in driving appetite for palatable food? *Brain Res.*, Oct 18; 952(2): 232-8
- HASUE, R.H., SHAMMAH-LAGNADO, S.J. (2002). Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, Dec. 2; 454(1): 15-33.
- HATFIELD, T. Y GALLAGHER, M. (1995). Taste-potentiated odor conditioning: impairment produced by infusion of an N-methyl-D-aspartate antagonist into basolateral amygdala. *Behav. Neurosci.*, 109(4), 663-668.
- HATFIELD, T., GRAHAM, P.W. Y GALLAGHER, M. (1992). Taste-potentiated odor aversion learning: role of the amygdaloid basolateral complex and central nucleus. *Behav. Neurosci.*, 106(2): 286-293.
- HAYES, A.G., SKINGLE, M. Y TYERS, M.B. (1986). Reversal by beta-funaltrexamine of the antinociceptive effect of opioid agonists in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, Aug; 88(4): 867-72.
- HERBERT, H. Y SAPER, C.B. (1990). Cholecystokinin-, galanin-, and corticotropin-releasing factor-like immunoreactive projections from the nucleus of the solitary tract to the parabrachial nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, Mar 22; 293(4):581-98.
- HERBERT, H., MOGA, M.M. Y SAPER, C.B. (1990). Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J. Comp. Neurol.*, Mar 22; 293(4): 540-80
- HERMANN, G.E. Y ROGERS, R.C. (1985). Convergence of vagal and gustatory afferent input within the parabrachial nucleus of the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.*, May; 13(1): 1-17
- HIGGINS, G.A. Y SELLERS, E.M. (1994). Antagonist-precipitated opioid withdrawal in rats: evidence for dissociations between physical and motivational signs. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, May; 48(1): 1-8.
- HIGGS, S. Y COOPER, S.J. (1996a). Hyperphagia induced by direct administration of midazolam into the parabrachial nucleus of the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, Oct 10; 313(1-2): 1-9
- HIGGS, S. Y COOPER, S.J. (1996b). Increased food intake following injection of the benzodiazepine receptor agonist midazolam into the IVth ventricle. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Sep; 55(1): 81-6
- HIGGS, S. Y COOPER, S.J. (1997). Midazolam-induced rapid changes in licking behaviour: evidence for involvement of endogenous opioid peptides. *Psychopharmacology (Berl)*, Jun; 131(3): 278-86
- HIROI, N. Y WHITE, N.M. (1991). The lateral nucleus of the amygdala mediates expression of the amphetamine-produced conditioned place preference. *J. Neurosci.*, Jul; 11(7): 2107-16.
- HITCHCOCK, J. Y DAVIS, M. (1986). Lesions of the amygdala, but not of the cerebellum or red nucleus, block conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. *Behav. Neurosci.*, 100(1), 11-22.
- HITCHCOCK, J. Y DAVIS, M. (1987). Fear-potentiated startle using and auditory conditioned stimulus: effect of lesions of the amygdala. *Physiol. Behav.*, 39(3), 403-408.
- HITCHCOCK, J. Y DAVIS, M. (1991). Efferent pathway of the amygdala involved in conditioned fear as measured with the fear-potentiated startle paradigm. *Behav. Neurosci.*, 105(6), 826-842.
- HOBBS, D.J., KOCH, J.E. Y BODNAR, R.J. (1994). Naltrexone, Dopamine Receptor Agonists and Antagonist, and Food Intake in Rats: 1. Food Deprivation. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 49 (1), 197-204.

- HOLAHAN, M.R. (2005). Complementary roles for the amygdala and hippocampus during different phases of appetitive information processing. *Neurobiol. Learn. Mem.*, Sep; 84(2): 124-31
- HÖLZER, P. (1991). Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol. Rev.*, Jun; 43(2): 143-201.
- HORN, C.C. Y FIEDMAN, M.I. (1998a). 2,5-Anhydro-D-mannitol induces Fos-like immunoreactivity in hindbrain and forebrain: relationship to eating behavior. *Brain Res.*, 779(1-2): 17-25.
- HORN, C.C. Y FIEDMAN, M.I. (1998a). Methyl palmoxirate increases eating and brain Fos-like immunoreactivity in rats. *Brain Res.*, 781(1-2): 8-14.
- HORN, C.C., TORDOFF, M.G. Y FIEDMAN, M.I. (2001). Role of vagal afferent innervation in feeding and brain Fos expression produced by metabolic inhibitors. *Brain Res.*, 919: 198-206.
- HOUP, T.A., PHILOPENA, J.M., WESSEL, T.C., JOH, T.H. Y SMITH, G.P. (1994). Increased *c-fos* expression in nucleus of the solitary tract correlated with conditioned taste aversion to sucrose in rats. *Neurosci. Letters*, 172 (1-2), 1-5.
- HOUP, T.A., PHILOPENA, J.M., JOH, T.H. Y SMITH, G.P. (1996). *C-fos* induction in the rat nucleus of the solitary tract by intraoral quinine infusion depends on prior contingent pairing of quinine and lithium chloride. *Physiol. Behav.*, 60(6), 1535-1541.
- HOUP, K.A., ZAHORIK, D.M. Y SWARTZMAN-ANDERT, J.A. (1990). Taste aversion learning in horses. *Journal of animal science*, Aug; 68(8); p. 2340-4
- HOWLAND, J.G., TAEPARAPRUK, P. Y PHILLIPS, A.G. (2002). Glutamate receptor-dependent modulation of dopamine efflux in the nucleus accumbens by basolateral, but not central, nucleus of the amygdala in rats. *J. Neurosci.*, Feb 1; 22(3): 1137-45.
- HUANG, Y.H., TSAI, S.J., YU, M.F., WANG, Y.C., YANG, Y.C. Y SIM, C.B. (1995). Dose-dependent effects of chronic amphetamine administration in local cerebral glucose utilization in rat. *Neuropsychobiology*, 32(3); p. 149-55
- HUGHES, P. Y DRAGUNOW, M. (1995). Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol. Rev.*, 47(1), 133-178.
- HUNT, G. E. Y MCGREGOR, I. S. (1998). Rewarding Brain Stimulation induces only sparse Fos-Like Immunoreactivity in Dopamine Neurons. *Neuroscience*, 83(2), 501-515.
- HUNT, W., RABIN, B. Y LEE, J. (1987). Ethanol-induced taste aversions: lack of involvement of acetaldehyde and the area postrema. *Alcohol*, 4, 169-173.
- HURD, Y.L., MCGREGOR, A. Y PONTEN, M. (1997). In vivo amygdala dopamine levels modulate cocaine self-administration behaviour in the rat: D1 dopamine receptor involvement. *Eur. J. Neurosci.*, 9(12): 2541-8.
- HYDE, T.M. Y MISELIS, R.R. (1982). Subnuclear organization of the human caudal nucleus of the solitary tract. *Brain Res. Bull.*, 29, 95-109.
- HYMAN, S. E. (1999). Substance Abuse Disorders. En: Charney, D. S., Nestler, E. J. & Bunney, B. S.: *Neurobiology of Mental Illness*. Oxford University Press, pp. 565-568.
- HYMAN, S.E. Y MALENKA, R.C. (2001). Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nature reviews Neuroscience*, Oct; 2(10); p. 695-703
- INAGAKI, S., SHIOTANI, Y., YAMANO, M., SHIOSAKA, S., TAKAGI, H., TATEISHI, K., HASHIMURA, E., HAMAOKA, T. Y TOHYAMA, M. (1984). Distribution, origin, and fine structures of cholecystokinin-8-like immunoreactive terminals in the nucleus ventromedialis hypothalami of the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, May; 4(5); p. 1289-99
- ITO, S. (1992). Multiple projections of vagal non-myelinated afferents to the anterior insular cortex. *Neurosci. Letters*, 148, 151-154.
- ITO, S. (1994). Electrophysiological evidence for projections of myelinated and non-myelinated primary vagal afferents to the rat insular cortex. *Neurosci. Letters*, 179, 29-32.
- IVANOVA, S. Y BURES, J. (1990). Acquisition of CTA in rats is prevented by TTX blockade of a small midbrain region centered around the parabrachial nucleus. *Physiol. and Behavior*, 48, 543-549.
- IWAMOTO, E.T. (1986). Comparison of the pharmacologic effects of N-allylnormetazocine and phencyclidine: sensitization, cross-sensitization, and opioid antagonist activity. *Psychopharmacology (Berl)*, 89(2): 221-9.
- JAEGER, T.V. Y VAN DER KOOY, D. (1996). Separate neural substrates mediate the motivating and discriminative properties of morphine. *Behav. Neurosci.*, Feb; 110(1): 181-201.

- JAFFE, K., ZABALA, N.A., DE BELLARD, M.E., GRANIER, M., ARAGORT, W. Y TABLANTE, A. (1990). Amino acids and memory consolidation in the cricket. II: Effect of injected amino acids and opioids on memory. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Jan; 35(1): 133-6.
- JANCSAR, S.M. Y LEONARD, B.E. (1984). Changes in neurotransmitter metabolism following olfactory bulbectomy in the rat. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 8(2); p. 263-9
- JANCSÓ, G., KIRALY, E., SUCH, G., JOO, F. Y NAGY, A. (1987). Neurotoxic effect of capsaicin in mammals. *Acta Physiol. Hung.*, 69(3-4): 295-313
- JASMIN, L., BOUDAH, A. Y OHARA, P.T. (2003). Long-term effects of decreased noradrenergic central nervous system innervation on pain behavior and opioid antinociception. *J. Comp. Neurol.*, May 19; 460(1): 38-55.
- JASMIN, L., BURKEY, A.R., CARD, J.P. Y BASBAUM, A.I. (1997). Transneuronal labeling of a nociceptive pathway, the spino-(trigemino-)parabrachio-amygdaloid, in the rat. *J. Neurosci.*, May 15; 17(10): 3751-65.
- JENKINS, O.F., ATRENS, D.M. Y JACKSON, D.M. (1983). Self-stimulation of the nucleus accumbens and some comparisons with hypothalamic self-stimulation. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 18(4):585-91.
- JHAMANDAS, J.H., PETROV, T., HARRIS, K.H., VU, T. Y KRUKOFF, T.L. (1996). Parabrachial nucleus projection to the amygdala in the rat: electrophysiological and anatomical observations. *Brain Res. Bull.*, 39(2), 115-126.
- JIA, H.G., RAO, Z.R. Y SHI, J.W. (1994). An indirect projection from the nucleus of the solitary tract to the central nucleus of the amygdala via the parabrachial nucleus in the rat: a light and electron microscopic study. *Brain Res.*, Nov 14; 663(2): 181-90.
- JIN, C., ARAKI, H., NAGATA, M., SHIMOSAKA, R., SHIBATA, K., SUEMARU, K., KAWASAKI, H. Y GOMITA, Y (2005). Expression of c-Fos in the rat central amygdala accompanies the acquisition but not expression of conditioned place aversion induced by withdrawal from acute morphine dependence. *Behav. Brain Res.*, Jun 3; 161(1): 107-12
- JONES, B. Y MISHKIN, M. (1972). Limbic lesions and the problem of stimulus-reinforcement associations. *Exp. Neurol.*, 36(2), 362-377.
- KALRA, S.P., DUBE, M.G., PU, S., XU, B., HORVATH, T.L. Y KALRA, P.S. (1999). Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr. Rev.*, Feb; 20(1): 68-100
- KANAREK, R.B., D'ANCI, K.E., PRZYPEK, J.M. Y MATHES, W.F. (1999). Altering dietary levels of protein or vitamins and minerals does not modify morphine-induced analgesia in male rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, Feb; 62(2); p. 203-8
- KANAREK, R.B., MATHES, W.F., HEISLER, L.K., LIMA, R.P. Y MONFARED, L.S. (1997). Prior exposure to palatable solutions enhances the effects of naltrexone on food intake in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, May-Jun; 57(1-2): 377-81
- KANAREK, R.B., WHITE, E.S., BIEGEN, M.T. Y MARKS-KAUFMAN, R. (1991). Dietary influences on morphine-induced analgesia in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, Mar; 38(3); p. 681-4.
- KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H. Y JESSELL, T. M. (2000). *Principles of Neural Science*, McGraw Hill (4th. Ed.).
- KANE, F., COULOMBE, D. Y MILIARESSIS, E. (1991). Interactions between amygdaloid and hypothalamic self-stimulation: a re-examination. *Behav. Brain Res.*, Aug 29; 44(2): 169-83.
- KAPLAN, J.M., SEELEY, R.J. Y GRILL, H.J. (1993). Daily caloric intake in intact and chronic decerebrate rats. *Behav. Neurosci.*, Oct; 107(5): 876-81
- KAPLAN, J.M., SIEMERS, W. Y GRILL, H.J. (1994). Ingestion, gastric fill, and gastric emptying before and after withdrawal of gastric contents. *The American journal of physiology*, Nov; 267(5 Pt 2); p. 1257-65
- KARIMNAMAZI, H., TRAVERS, S.P. Y TRAVERS, J.B. (2002). Oral and gastric input to the parabrachial nucleus of the rat. *Brain Res.*, Dec 13; 957(2): 193-206
- KELLEY, A. E. Y BERRIDGE, K.C. (2002). The Neuroscience of Natural Rewards: Relevance to Addictive Drugs. *The J. of Neuroscience*, 22 (9), 3306-3311.
- KELLEY, A.E., BAKSHI, V.P., FLEMING, S. Y HOLAHAN, M.R. (2000). A pharmacological analysis of the substrates underlying conditioned feeding induced by repeated opioid stimulation of the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, Oct; 23(4); p. 455-67



- KELLEY, A.E., BAKSHI, V.P., HABER, S.N., STEININGER, T.L., WILL, M.J. Y ZHANG, M. (2002). Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum. *Physiol. Behav.*, Jul; 76(3): 365-77.
- KELLEY, T.J., COTTON, C.U. Y DRUMM, M.L. (1997). In vivo activation of CFTR-dependent chloride transport in murine airway epithelium by CNP. *The American journal of physiology*, Nov; 273(5 Pt 1); p. L1065-72.
- Kelly, J.P., Wrynn, A.S. Y Leonard B.E. (1997). The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: An update Review Article. *Pharmacology & Therapeutics*, 74(3): 299-316
- KELLY, L.A., CHAVEZ, M. Y BERTHOUD, H.R. (1999). Transient overconsumption of novel foods by deafferentated rats: effects of novel diet composition. *Physiol. Behav.*, Jan 1-15; 65(4-5): 793-800
- KELLY, L.A., MORALES, S., SMITH, B.K. Y BERTHOUD, H.R. (2000). Capsaicin-treated rats permanently overingest low- but not high-concentration sucrose solutions. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, Nov; 279(5): R1805-12
- KELSEY, J.E. Y ARNOLD, S.R. (1994). Lesions of the dorsomedial amygdala, but not the nucleus accumbens, reduce the aversiveness of morphine withdrawal in rats. *Behav. Neurosci.*, Dec; 108(6): 1119-27.
- KELSEY, J.E., BELLUZZI, J.D. Y STEIN, L. (1984). Does naloxone suppress self-stimulation by decreasing reward or by increasing aversion? *Brain Res.*, Jul 30; 307(1-2): 55-9
- KELSEY, J.E., CARLEZON, W.A. JR. Y FALLS, W.A. (1989). Lesions of the nucleus accumbens in rats reduce opiate reward but do not alter context-specific opiate tolerance. *Behav. Neurosci.*, Dec; 103(6): 1327-34
- KEMBLE, E.D., STUDELSKA, D.R. Y SCHMIDT, M.K. (1979). Effects of central amygdaloid nucleus lesions on ingestion, taste reactivity, exploration and taste aversion. *Physiology & behavior*, Apr; 22(4); p. 789-93.
- KESNER, R.P., BERMAN, R.F. Y TARDIF, R. (1992). Place and taste aversion learning: role of basal forebrain, parietal cortex, and amygdala. *Brain research bulletin*, Sep-Oct; 29(3-4); p. 345-53
- KEYS, A., BROZ, J., HENSCHER, A., MICKELSEN, O. Y TAYLOR, H.L. (1950). *The biology of human starvation*, Minneapolis: The University of Minnesota Press.
- KIEFER, S. (1985). Neural mediation of conditioned food aversions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 443, 100-9.
- KIEFER, S. Y MORROW, N.S. (1991). Odor cue mediation of alcohol aversion learning in rats learning gustatory neocortex. *Behavioral Neurosci.*, 105, 25-32.
- KIEFER, S., CABRAL, R., RUSINIAK, K. Y GARCIA, J. (1980). Ethanol-induced flavor aversions in rats with subdiaphragmatic vagotomy. *Behavior. and Neural Biol.*, 29, 246-254.
- KIEFFER, B.L. Y GAVÉRIAUX-RUFF, C. (2002). Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog. Neurobiol.*, Apr; 66(5): 285-306.
- KILLCROSS S., ROBBINS T.W. Y EVERITT B.J. (1997). Different types of fear-conditioned behavior mediated by separate nuclei within amygdala. *Nature*, 388: 377-380.
- KILPATRICK, L. Y CAHILL, L. (2003). Modulation of memory consolidation for olfactory learning by reversible inactivation of the basolateral amygdala. *Behav. Neurosci.*, 117(1), 184-188.
- KING, B.M., ARCENEUAUX, E.R., COOK, J.T., BENJAMIN, A.L. Y ALHEID, G.F. (1996). Temporal lobe lesion-induced obesity in rats: an anatomical investigation of the posterior amygdala and hippocampal formation. *Physiol. Behav.*, Apr-May; 59(4-5): 843-8.
- KING, B.M., COOK, J.T., ROSSITER, K.N. Y ROLLINS, B.L. (2003). Obesity-inducing amygdala lesions: examination of anterograde degeneration and retrograde transport. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*, Apr; 284(4); p. R965-82.
- KING, B.M., KASS, J.M., NEVILLE, K.L., SAM, H., TATFORD, A.C. 3RD, Y ZANSLER, C.A. (1993a). Abnormal weight gain in rats with amygdaloid lesions. *Physiology & behavior*, Sep; 54(3); p. 467-70
- KING, B.M., KASS, J.M., CADIEUX, N.L., SAM, H., NEVILLE, K.L. Y ARCENEUAUX, E.R. (1993b) Hyperphagia and obesity in female rats with temporal lobe lesions. *Physiology & behavior*, Oct; 54(4); p. 759-65
- KING, B.M., ROLLINS, B.L., STINES, S.G., CASSIS, S.A., MCGUIRE, H.B. Y LAGARDE, M.L. (1999). Sex differences in body weight gains following amygdaloid lesions in rats. *The American journal of physiology*, Oct; 277(4 Pt 2); p. R975-80
- KING, B.M., ROSSITER, K.N., COOK, J.T. Y SAM, H.M. (1997). Amygdaloid lesion-induced obesity in rats in absence of finickiness. *Physiology & behavior*, Oct; 62(4); p. 935-8

- KING, B.M., ROSSITER, K.N., STINES, S.G., ZAHARAN, G.M., COOK, J.T., HUMPHRIES, M.D. Y YORK, D.A. (1998). Amygdaloid-lesion hyperphagia: impaired response to caloric challenges and altered macronutrient selection. *The American journal of physiology*, Aug; 275(2 Pt 2); p. R485-93
- KING, B.M., SAM, H., ARCENEUAUX, E.R. Y KASS, J.M. (1994). Effect on food intake and body weight of lesions in and adjacent to the posterodorsal amygdala in rats. *Physiol. Behav.*, 55 (5): 963-6.
- KIRKHAM, T.C. (1990). Enhanced anorectic potency of naloxone in rats sham feeding 30% sucrose: reversal by repeated naloxone administration. *Physiol. Behav.*, Mar; 47(3): 419-26
- KIRKHAM, T.C. Y BLUNDELL, J.E. (1984). Dual action of naloxone on feeding revealed by behavioural analysis: separate effects on initiation and termination of eating. *Appetite*, Mar; 5(1); p. 45-52
- KIRKHAM, T.C. Y BLUNDELL, J.E. (1986). Effect of naloxone and naltrexone on the development of satiation measured in the runway: comparisons with d-amphetamine and d-fenfluramine. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Jul; 25(1): 123-8
- KIRKHAM, T.C. Y COOPER, S.J. (1988a). Attenuation of sham feeding by naloxone is stereospecific: evidence for opioid mediation of osensory reward. *Physiol. Behav.*, 43(6): 845-7
- KIRKHAM, T.C. Y COOPER, S.J. (1988b). Naloxone attenuation of sham feeding is modified by manipulation of sucrose concentration. *Physiol. Behav.*, 44(4-5): 491-4
- KIRKHAM, T.C. Y WILLIAMS, C.M. (2001). Synergistic effects of opioid and cannabinoid antagonists on food intake. *Psychopharmacology (Berl)*, Jan 1; 153(2): 267-70
- KIRKHAM, T.C., WILLIAMS, C.M., FEZZA, F. Y DI MARZO, V. (2002). Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br. J. Pharmacol.*, Jun; 136(4): 550-7
- KLING, A.S. Y BROTHERS, L. (1992). The amygdala and social behavior. In: Aggleton, J.P. (Ed.), *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction*, 1st edn. Wiley-Liss, New York, pp. 353-378.
- KOBASHI, M. Y ADACHI, A. (1986). Projection of nucleus tractus solitarius units influenced by hepatoportal afferent signal to parabrachial nucleus. *Journal of the autonomic nervous system*, Jun; 16(2); p. 153-8
- KOBASHI, M., ICHIKAWA, H., SUGIMOTO, T. Y ADACHI, A. (1993). Response of neurons in the solitary tract nucleus, area postrema and lateral parabrachial nucleus to gastric load of hypertonic saline. *Neurosci. Lett.*, Aug 6; 158(1): 47-50
- KOEGLER, F.H., YORK, D.A. Y BRAY, G.A. (1999). The effects on feeding of galanin and M40 when injected into the nucleus of the solitary tract, the lateral parabrachial nucleus, and the third ventricle. *Physiology & behavior*, Aug; 67(2); p. 259-67
- KOIKEGAMI, H. (1964). Amygdala and other related limbic structures; experimental studies on the anatomy and function. II. Functional Experiments. *Acta medica et biologica*, Dec; 12; p. 73-266
- KOLAKOWSKA, L., LARUE-ACHAGIOTIS, C. Y LE MAGNEN, J. (1985). Effect of amygdaloid lesions on ethanol intake in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, Sep; 23(3); p. 333-8
- KONKLE, A.T., WILSON, P. Y BIELAJEW, C. (1999). Histochemical mapping of the substrate for brain-stimulation reward with glycogen phosphorylase. *Journal of neuroscience methods*, Nov 15; 93(2); p. 111-9
- KOOB, G.F. (1992). Drugs of Abuse: Anatomy, Pharmacology and Function of Reward Pathways. *Trends in Pharmacological Sciences*, Vol.13, 177-184.
- KOOB, G.F. (1998). Circuits, drugs, and drug addiction. *Adv. Pharmacol.*, 42: 978-82
- KOOB, G.F. (1999). Animal models of addictive disorders. *European Neuropsychopharmacology*, 9 (5), 171-173.
- KOOB, G.F. (2000). Neurobiology of addiction. Toward the development of new therapies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 909; p. 170-85
- KOOB, G.F. (2004). Allostatic view of motivation: implications for psychopathology. *Nebr. Symp. Motiv.*, 50: 1-18
- KOOB, G.F. y LE MOAL, M.L. (2001). Drug Addiction, Dysregulation of Reward, and Allostasis. *Neuropsychopharmacology*, Vol.24, N°2,97-129.
- KOOB, G.F. Y BLOOM, F.E. (1988). Cellular and Molecular Mechanisms of Drug Dependence. *Science*, 242, 715-721.

- KOOB, G.F., HEINRICH, S.C., PICH, E.M., MENZAGHI, F., BALDWIN, H., MICZEK, K. Y BRITTON, K.T. (1993). The role of corticotropin-releasing factor in behavioural responses to stress. *Ciba Found Symp.*, 172: 277-89; discussion 290-5
- KOOB, G.F., ROBERTS, A.J., KIEFFER, B.L., HEYSER, C.J., KATNER, S.N., CICCOCIOPO, R. Y WEISS, F. (2003). Animal models of motivation for drinking in rodents with a focus on opioid receptor neuropharmacology. *Recent Dev. Alcohol.*, 16: 263-81
- KOOB, G.F., ROCIO, M., CARRERA, A., GOLD, L.H., HEYSER, C.J., MALDONADO-IRIZARRY, C., MARKOU, A., PARSONS, L.H., ROBERTS, A.J., SCHULTEIS, G, STINUS, L., WALKER, J.R., WEISSENBERN, R. Y WEISS, F. (1998). Substance Dependence as a Compulsive Behavior. *Journal of Psychopharmacology*, 12(1), 39-48.
- KOOB, G.F., STINUS, L., LE-MOAL, M. Y BLOOM, F.E. (1989). Opponent process theory of motivation: neurobiological evidence from studies of opiate dependence. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, Summer-Fall; 13(2-3): 135-40
- KOOB, G.F., STRECKER, R.E Y BLOOM, F.E. (1980). Effects of naloxone on the anticonflict properties of alcohol and chlordiazepoxide. *Subst. Alcohol Actions Misuse*, 1(5-6): 447-57
- KOTZ, C.M., BILLINGTON, C.J. Y LEVINE, A.S. (1997). Opioids in the nucleus of the solitary tract are involved in feeding in the rat. *Am. J. Physiol.*, Apr; 272(4 Pt 2): R1028-32
- KOTZ, C.M., GRACE, M.K., BRIGGS, J., LEVINE, A.S. Y BILLINGTON, C.J. (1995). Effects of opioid antagonists naloxone and naltrexone on neuropeptide Y-induced feeding and brown fat thermogenesis in the rat. Neural site of action. *J. Clin. Invest.*, Jul; 96(1): 163-70
- KRAL, J.G. (1983). Behavioral effects of vagotomy in humans. *J. Auton. Nerv. Syst.*, Oct; 9(1): 273-81
- KRALY, F.S. Y SMITH, G.P. (1978). Combined pregastric and gastric stimulation by food is sufficient for normal meal size. *Physiology & behavior*, Sep; 21(3); p. 405-8
- KRALY, F.S., GIBBS, J. Y SMITH, G.P. (1975). Disordered drinking after abdominal vagotomy in rats. *Nature*, Nov 20; 258(5532): 226-8
- KRALY, F.S., JEROME, C. Y SMITH, G.P. (1986). Specific postoperative syndromes after total and selective vagotomies in the rat. *Appetite*, Mar; 7(1): 1-17
- KREEK, M.J. Y KOOB, G.F. (1998). Drug dependence: stress and dysregulation of brain reward pathways. *Drug and alcohol dependence*, Jun-Jul; 51(1-2); p. 23-47
- KRETTEK, J.E. Y PRICE, J.L. (1978). A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. *J. Comp. Neurol.*, 178(2), 255-280.
- KRIVANEC, J. (1993). Protein Kinase C in nucleus Parabrachialis: effect of drugs inducing conditioned taste aversions. *Brain Res.*, 629, 327-330.
- KROUT, K.E. Y LOEWY, A.D. (2000). Parabrachial nucleus projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol.*, Dec 18; 428(3): 475-94
- KRUKOFF, T.L., HARRIS, K.H. Y JHAMANDAS, J.H. (1993). Efferent projections from the parabrachial nucleus demonstrated with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Brain research bulletin*, 30(1-2); p. 163-72
- KRUKOFF, T.L., HARRIS, K.H., LINETSKY, E. Y JHAMANDAS, J.H. (1994). Expression of *c-fos* protein in rat brain elicited by electrical and chemical stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*, Jun; 59(6): 590-60
- KRUZICH, P.J. Y SEE, R.E. (2001). Differential contributions of the basolateral and central amygdala in the acquisition and expression of conditioned relapse to cocaine-seeking behavior. *J. Neurosci.*, Jul 15; 21(14): RC155.
- KYRIAZAKIS, I., TOLKAMP, B.J. Y EMMANS, G. (1999). Diet selection and animal state: an integrative framework. *The Proceedings of the Nutrition Society*, Nov; 58(4); p. 765-72
- LADOWSKY, R.L. Y OSSENKOPP, K. (1986). Conditioned taste aversions and changes in motor activity in Lithium-treated rats. *Neuropharmacology*, 25(1), 71-77.
- LALONDE, R. Y BOTEZ, M.I. (1990). The cerebellum and learning processes in animals. *Brain research Brain research reviews*, Sep-Dec; 15(3); p. 325-32
- LAMONTE, N., ECHO, J.A., ACKERMAN, T.F., CHRISTIAN, G. Y BODNAR, R.J. (2002). Analysis of opioid receptor subtype antagonist effects upon mu opioid agonist-induced feeding elicited from the ventral tegmental area of rats. *Brain Res.*, Mar 1; 929(1): 96-100

- LAMPRECHT, R. Y DUDAI, Y (2000). The amygdala in conditioned taste aversion: it's there, but where. En Aggleton, J.P. *The Amygdala. A functional analysis*, 2nd. Ed. OOP, 329-351.
- LANGHANS, W. (2000). Anorexia of infection: current prospects. *Nutrition*, Oct; 16(10): 996-1005
- LASITER, P.S. (1982). Cortical substrates of taste aversion learning. Direct amigdalocortical projections to the gustatory neocortex do not mediate conditioned taste aversions learning. *Physiol. Psychol.*, 10(4), 377-383.
- LASITER, P. Y GLANZMAN, D. L. (1982). Cortical substrates of taste aversion learning: dorsal prepiriform (insular) lesions disrupt taste aversion learning. *J. of Comp. And Physiol. Psychol.*, 96(3), 376-392.
- LASITER, P. Y GLANZMAN, D. (1985). Cortical substrates of taste aversion learning: involvement of dorsolateral amigdaloid nuclei and temporal neocortex in taste aversion learning. *Behavioral Neurosci.*, 99(2), 257-276.
- LAVOND, D.G., KIM, J.J. Y THOMPSON, R.F. (1993). Mammalian brain substrates of aversive classical conditioning. *Annual review of psychology*, 44; p. 317
- LAW, P.Y. Y LOH, H.H. (1999). Regulation of opioid receptor activities. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, May; 289(2): 607-24
- LE DOUX, J.E. (1992). Brain mechanisms of emotion and emotional learning. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2(2), 191-197
- LE DOUX, J.E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.*, 23, 155-84.
- LE DOUX, J.E., CICCHETTI, P., XAGORARIS, A. Y ROMANSKI, L.M. (1990). The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J. Neurosci.*, Apr; 10(4): 1062-9.
- LE FOLL, B. Y GOLDBERG, S.R. (2005a). Cannabinoid CB1 receptor antagonists as promising new medications for drug dependence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Mar; 312(3): 875-83.
- LE FOLL, B. Y GOLDBERG, S.R. (2005b). Nicotine induces conditioned place preferences over a large range of doses in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 178(4): 481-92.
- LE FOLL, B. Y GOLDBERG, S.R. (2005c). Ethanol does not affect discriminative-stimulus effects of nicotine in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 5; 519(1-2): 96-102.
- LE GUEN, S., GESTREAU, C. Y BESSON, J.M. (2001). Sensitivity to naloxone of the behavioral signs of morphine withdrawal and c-Fos expression in the rat CNS: a quantitative dose-response analysis. *J. Comp. Neurol.*, Apr 30; 433(2): 272-96.
- LE GUEN, S., GESTREAU, C. Y BESSON, J.M. (2003). Morphine withdrawal precipitated by specific mu, delta or kappa opioid receptor antagonists: a c-Fos protein study in the rat central nervous system. *Eur. J. Neurosci.*, Jun; 17(11): 2425-37.
- LE MAGNEN, J. (1992). *Neurobiology of feeding and nutrition*, Academic Press.
- LE MAGNEN, J., MARFAING-JAILLAT, P., MICELI, D. Y DEVOS, M. (1980). Pain Modulating and Reward Systems: A Single Brain Mechanism?. *Pharmacol., Bioch. & Beh.*, 12, 729-733.
- LEATON, R.N. Y SUPPLE, W.F. Jr. (1991). Medial cerebellum and long-term habituation of acoustic startle in rats. *Behavioral neuroscience*, Dec; 105(6); p. 804-16
- LEONARD, L. Y HAHN, Z. (1982). Amygdalar noradrenergic and dopaminergic mechanisms in the regulation of hunger and thirst-motivated behavior. *Brain research*, Feb 4; 233(1); p. 115-32
- LEONARD, L., HAHN, Z. Y KAREDI, Z. (1982). Body weight changes after neurochemical manipulations of lateral amygdala: noradrenergic and dopaminergic mechanisms. *Brain research*, Oct 7; 249(1); p. 95-101
- LEPORE, M. Y FRANKLIN, K.B. (1996). N-methyl-D-aspartate lesions of the pedunclopontine nucleus block acquisition and impair maintenance of responding reinforced with brain stimulation. *Neuroscience*, Mar; 71(1); p. 147-55
- LESCHEM, M. (1999). The ontogeny of salt hunger in the rat. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, May; 23(5); p. 649-59
- LESCHEM, M., DEL CANHO, S. Y SCHULKIN, J. (1999). Calcium hunger in the parathyroidectomized rat is specific. *Physiology & behavior*, Oct; 67(4); p. 555-9
- LESLIE, R.A., MURPHY, K.M. Y ROBERTSON, H.A. (1989). Nodose ganglionectomy selectively reduces muscarinic cholinergic and delta opioid binding sites in the dorsal vagal complex of the cat. *Neuroscience*, 32(2); p. 481-92.

- LEVINE, A.S. (2006). The animal model in food intake regulation: examples from the opioid literature. *Physiol. Behav.*, Aug 30; 89(1): 92-6
- LEVINE, A.S. Y BILLINGTON, C.J. (1989). Opioids. Are they regulators of feeding? *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 575: 209-19; discussion 219-20
- LEVINE, A.S. Y BILLINGTON, C.J. (1997). Why do we eat? A neural systems approach. *Annu. Rev. Nutr.*, 17: 597-619
- LEVINE, A.S. Y BILLINGTON, C.J. (2004). Opioids as agents of reward-related feeding: a consideration of the evidence. *Physiol. Behav.*, Aug; 82(1): 57-61
- LEVINE, A.S., GRACE, M.K., CLEARY, J.P. Y BILLINGTON, C.J. (2002). Naltrexone infusion inhibits the development of preference for a high-sucrose diet. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*, Nov; 283(5); p. R1149-54.
- Levine, A.S., Murray, S.S., Kneip, J., Grace, M. Y Morley J.E. (1982). Flavor enhances the antidipsogenic effect of naloxone. *Physiology and Behavior*, Jan; 28(1): 23-25
- LEVINE, A.S., OLSZEWSKI, P.K., MULLETT, M.A., POMONIS, J.D., GRACE, M.K., KOTZ, C.M. Y BILLINGTON, C.J. (2004). Intra-amygdalar injection of DAMGO: effects on c-Fos levels in brain sites associated with feeding behavior. *Brain research*, Jul 23; 1015(1-2); p. 9-14
- LI, B.H. Y ROWLAND, N.E. (1993). Dexfenfluramine induces Fos-like immunoreactivity in discrete brain regions in rats. *Brain Res. Bull.*, 31(1-2): 43-8
- LI, B.H. Y ROWLAND, N.E. (1994). Cholecystokinin- and dexfenfluramine-induced anorexia compared using devazepide and *c-fos* expression in the rat brain. *Regulatory peptides*, Mar 17; 50(3); p. 223-33
- LI, B.H. Y ROWLAND, N.E. (1995). Effects of vagotomy on cholecystokinin- and dexfenfluramine-induced Fos-like immunoreactivity in the rat brain. *Brain-Res-Bull.*, 37(6): 589-93
- LI, B.H., SPECTOR, A.C. Y ROWLAND, N.E. (1994). Reversal of dexfenfluramine-induced anorexia and c-Fos/c-Jun expression by lesion in the lateral parabrachial nucleus. *Brain Res.*, Mar 21; 640(1-2): 255-67
- LIU, M., MAIORANO, N., SHEN, L., PEARSON, K., TAJIMA, D., ZHANG, D.M., WOODS, S.C., SEELEY, R.J., DAVIDSON, W.S. Y TSO, P. (2003). Expression of biologically active rat apolipoprotein AIV in *Escherichia coli*. *Physiol. Behav.*, 78(1), 149-155.
- LOEWY, A.D. (1991). Forebrain nuclei involved in autonomic control. *Progress in brain research*, 87; p. 253-68
- LOEWY, A.D. Y BURTON, H. (1978). Nuclei of the solitary tract: Efferent projections to the lower brain stem and spinal cord of the cat. *J. Comp. Neurol.*, 181: 421-450
- LÓPEZ-GRANCHA, M., SÁNCHEZ-AMATE, C., NAVARRO, M., CARVAJAL, F., SÁNCHEZ-SANTED, F. Y CUBERO, I. (2006). Lateral parabrachial lesions disrupt paraoxon-induced conditioned flavor avoidance. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, May; 91(1); p. 210-7.
- LORENZ, D.N. (1983). Effects of gastric filling and vagotomy on ingestion, nipple attachment, and weight gain by suckling rats. *Dev. Psychobiol.*, Nov; 16(6): 469-83
- LOUIS-SYLVESTRE, J. (1983). Validation of tests of completeness of vagotomy in rats. *J. Auton. Nerv. Syst.*, Oct; 9(1): 301-14.
- LU, L., ZENG, S., LIU, D. Y CENG, X. (2000). Inhibition of the amygdala and hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II attenuates the dependence and relapse to morphine differently in rats. *Neurosci. Lett.*, Sep 22; 291(3): 191-5.
- LUCAS, F. Y SCLAFANI, A. (1989). Flavor preferences conditioned by intragastric fat infusions in rats. *Physiology & Behavior*, 46, 403-412
- LUNDY, R.F. JR. Y NORNGREN, R. (2001). Pontine gustatory activity is altered by electrical stimulation in the central nucleus of the amygdala. *J. Neurophysiol.*, Feb; 85(2): 770-83
- LYNCH, W.C. Y LIBBY, L. (1983). Naloxone suppresses intake of highly preferred saccharin solutions in food deprived and sated rats. *Life Sci.*, Nov 7; 33(19): 1909-14
- LYNCH, W.C., WATT, J., KRALL, S. Y PADEN, C.M. (1985). Autoradiographic localization of kappa opiate receptors in CNS taste and feeding areas. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, May; 22(5): 699-705
- MAJEED, N.H., LASON, W., PRZEWLOCKA, B. Y PRZEWLOCKI, R. (1986). Brain and peripheral opioid peptides after changes in ingestive behavior. *Neuroendocrinology*, 42(3): 267-72

- MALDONADO, R., SAIARDI, A., VALVERDE, O., SAMAD, T.A., ROQUES, B.P. Y BORRELI, E. (1997). Absence of Opiate Rewarding Effects in Mice Lacking Dopamine D2 Receptors. *Nature*, Vol 388, 586-589.
- MALDONADO, R., STINUS, L., GOLD, L.H. Y KOOB, G.F. (1992). Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, May; 261(2): 669-77.
- MANSOUR, A., FOX, C.A., AKIL, H. Y WATSON, S.J. (1995a). Opioid-Receptor mRNA Expression in the Rat CNS: Anatomical and Functional Implications. *Trends in Neurosci.*, 18 (1), 22-29.
- MANSOUR, A., WATSON, S.J. Y AKIL, H. (1995b). Opioid receptors: past, present and future. *Trends Neurosci.*, Feb; 18(2): 69-70.
- MANSOUR, A., KHACHATURIAN, H., LEWIS, M.E., AKIL, H. Y WATSON, S.J. (1988). Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends in neurosciences*, Jul; 11(7); p. 308-14.
- MANZANARES, J., CORCHERO, J. Y FUENTES, J.A. (1999). Opioid and cannabinoid receptor-mediated regulation of the increase in adrenocorticotropin hormone and corticosterone plasma concentrations induced by central administration of delta(9)-tetrahydrocannabinol in rats. *Brain Res.*, Aug 21; 839(1): 173-9
- MANZANEDO, C., AGUILAR, M.A., RODRÍGUEZ ARIAS, M. Y MINARRO, J. (2001a). Effects of dopamine antagonists with different receptor blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice. *Behav. Brain Res.*, Jun; 121(1-2): 189-97.
- MANZANEDO, C., SERRANO, A., AGUILAR, M.A., RODRÍGUEZ ARIAS, M. Y MINARRO, J. (2001b). Effects of CGS 10746B on hyperactivity and place preference induced by morphine. *Behav. Brain Res.*, Nov 29; 126(1-2): 23-32.
- MARCHETTI-GAUTHIER, E., MEZIANE, H., DEVIGNE, C. Y SOUMIREU-MOURAT, B. (1990). Effects of bilateral lesions of the cerebellar interpositus nucleus on the conditioned forelimb flexion reflex in mice. *Neuroscience letters*, Nov 27; 120(1); p. 34-7
- MAREN, S. (1996). Synaptic transmission and plasticity in the amygdala. An emerging physiology of fear conditioning circuits. *Mol. Neurobiol.*, 13(1), 1-22.
- MAREN, S. (1999). Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. *Trends Neurosci.*, 22(12), 561-567.
- MAREN, S., AHARONOV, G., STOTE, D.L. Y FANSELOW, M.S. (1996). N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. *Behav. Neurosci.*, 110(6), 1365-1374.
- MARK, G., SCOTT, T., CHANG, F. Y GRILL, H. (1988). Taste responses in the nucleus tractus solitarius of the chronic decerebrate rat. *Brain Res.*, 443, 137-148.
- MARKS-KAUFMAN, R., BALMAGIYA, T. Y GROSS, E. (1984). Modifications in food intake and energy metabolism in rats as a function of chronic naltrexone infusions. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Jun; 20(6): 911-
- MARSICANO, G. Y LUTZ, B. (1999). Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur. J. Neurosci.*, Dec; 11(12): 4213-25
- MARTEL, P. Y FANTINO, M. (1996). Mesolimbic Dopaminergic System Activity as a Function of Food Reward: A Microdialysis Study. *Pharmacol. Biochem. & Behavior*, 53 (1), 221-226.
- MARTIN, G.M. Y LETT, B.T. (1985). Formation of associations of colored and flavored food with induced sickness in five avian species. *Behavioral and neural biology*, May; 43(3); p. 223-37.
- MARTIN, J.H. (1997). El Sistema Límbico. En Martín, J.H. *Neuroanatomía*, 2nd. Ed. Prentice Hall, 445-478.
- MARTIN, J.R., CHENG, F.Y. Y NOVIN, D. (1978). Acquisition of learned taste aversion following bilateral subdiaphragmatic vagotomy in rats. *Physiol. Behav.*, Jul; 21(1): 13-7
- MARTIN-SCHILD, S., GERALL, A.A., KASTIN, A.J. Y ZADINA, J.E. (1999). Differential distribution of endomorphin 1- and endomorphin 2-like immunoreactivities in the CNS of the rodent. *J. Comp. Neurol.*, Mar 22; 405(4): 450-71
- MATTHES, H., SEWARD, E.P., KIEFFER, B. Y NORTH, R.A. (1996). Functional selectivity of orphanin FQ for its receptor coexpressed with potassium channel subunits in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol. Pharmacol.*, Sep; 50(3): 447-50.
- MAYNE, R.G., ARMSTRONG, W.E., CROWLEY, W.R. Y BEALER, S.L. (1998). Cytoarchitectonic analysis of Fos-immunoreactivity in brainstem neurones following visceral stimuli in conscious rats. *J. Neuroendocrinol.*, Nov; 10(11): 839-47

- MAZDA, T., YAMAMOTO, H., FUJIMURA, M. Y FUJIMIYA, M. (2004). Gastric distension-induced release of 5-HT stimulates *c-fos* expression in specific brain nuclei via 5-HT<sub>3</sub> receptors in conscious rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 287, G228-G235
- McALLISTER, K.H. Y PRATT, J.A. (1998). GR205171 blocks apomorphine and amphetamine-induced conditioned taste aversions. *Eur. J. Pharmacol.*, 353 (2-3), 141-148.
- McDONALD, A.J. Y MASCAGNI, F. (1996). Cortico-cortical and cortico-amygdaloid projections of the rat occipital cortex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study. *Neuroscience*, Mar; 71(1): 37-54.
- McDONALD, J., BARNES, T.A., OKAWA, H., WILLIAMS, J., CALO', G., ROWBOTHAM, D.J. Y LAMBERT, D.G. (2003). Partial agonist behaviour depends upon the level of nociceptin/orphanin FQ receptor expression: studies using the ecdysone-inducible mammalian expression system. *Br. J. Pharmacol.*, Sep; 140(1): 61-70
- McDONALD, R.J. Y HONG, N.S. (2004). A dissociation of dorso-lateral striatum and amygdala function on the same stimulus-response habit task. *Neuroscience*, 124(3): 507-13.
- McDONALD, R.J. Y WHITE, N.M. (1993). A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behav. Neurosci.*, Feb; 107(1): 3-22.
- McINTYRE, C.K., RAGOZZINO, M.E. Y GOLD, P.E. (1998). Intra-amygdala infusions of scopolamine impair performance on a conditioned place preference task but not a spatial radial maze task. *Behav. Brain Res.*, Oct; 95(2): 219-26.
- MEDIAVILLA, C. (1995). El cerebelo y circuitos asociados en aprendizaje aversivo gustativo. *Tesis Doctoral*, Universidad de Granada
- MEDIAVILLA, C., MOLINA, F. Y PUERTO, A. (1998). Bilateral lesions in the cerebellar interpositus-dentate region impair taste aversion learning in rats. *Physiol. Behav.*, 65(1), 25-33.
- MEDIAVILLA, C., MOLINA, F. Y PUERTO, A. (1999). Inferior olive lesions impair concurrent taste aversion learning in rats. *Neurobiol. of Learn. and Mem.*, 72(1), 13-27.
- MEDIAVILLA, C., MOLINA, F. Y PUERTO, A. (2000). The role of the Lateral Parabrachial Nuclei in Concurrent and Sequential Taste Aversion Learning in Rats. *Experimental Brain Research*, 134, 497-505.
- MEDIAVILLA, C., MOLINA, F. Y PUERTO, A. (2001). Effects of a flavor-placement reversal test after different modalities of taste aversion learning. *Neurobiol. of Learn. and Mem.*, 76(2), 209-224.
- MEDIAVILLA, C., MOLINA, F. Y PUERTO, A. (2005). Concurrent conditioned taste aversion: a learning mechanism based on rapid neural versus flexible humoral processing of visceral noxious substances. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 29(7); p. 1107-18
- MEDIAVILLA, C., BERNAL, A., MAHÍA, J. Y PUERTO, A. (2011). Nucleus of the solitary tract and flavor aversion learning: relevance in concurrent but not sequential behavioral test. *Behav. Brain Res.*, 223(2): 287-292
- MENANI, J.V., BARBOSA, S.P., DE LUCA, L.A. JR., DE GOBBI, J.I., JOHNSON, A.K. (2002). Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus and cholinergic-induced sodium appetite. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, Mar; 282(3): R837-41
- MENANI, J.V., THUNHORST, R.L. Y JOHNSON, A.K. (1996). Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. *Am. J. Physiol.*, Jan; 270(1 Pt 2): R162-8
- MICHL, T., JOCIC, M., HEINEMANN, A., SCHULIGOI, R. Y HOLZER, P. (2001). Vagal afferent signaling of a gastric mucosal acid insult to medullary, pontine, thalamic, hypothalamic and limbic, but not cortical, nuclei of the rat brain. *Pain*, May; 92(1-2): 19-27
- MIDKIFF, E.E. Y BERNSTEIN, I.L. (1985). Targets of learned food aversions in humans. *Physiology & behavior*, May; 34(5); p. 839-41.
- MILAK, M.S., SHIMANSKY, Y., BRACHA, V. Y BLOEDEL, J.R. (1997). Effects of inactivating individual cerebellar nuclei on the performance and retention of an operantly conditioned forelimb movement. *Journal of neurophysiology*, Aug; 78(2); p. 939-59
- MILNER, B. (1972). Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. *Clin. Neurosurg.*, 19, 421-446.
- MILNER, P. (1989). The Discovery of Self-Stimulation and Other Stories. *Neurosc. & Biobeh. Reviews*, 13, 61-67.

- MISERENDINO, M.J., SANANES, C.B., MELIA, K.R. Y DAVIS, M. (1990). Blocking of acquisition but not expresión of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature*, 345(6277), 716-718.
- MOGA, M.M., SAPER, C.B. Y GRAY, T.S. (1990). Neuropeptide organization of the hypothalamic projection to the parabrachial nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, May 22; 295(4): 662-82
- MOLINA, F. Y PUERTO, A. (1981). El condicionamiento aversivo gustativo como modelo especializado de aprendizaje. En: *Psicología Experimental*, Tudela, P. UNED.
- MÖNNIKES, H., LAUER, G., BAUER, C., TEBBE, J., ZITTEL, T.T. Y ARNOLD, R. (1997), Pathways of Fos expression in locus coeruleus, dorsal vagal complex, and PVN in response to intestinal lipid. *Am. J. Physiol.*, 273, R2059-R2071
- MONROE, S. Y DI LORENZO, P.M. (1995). Taste responses in neurons in the Nucleus of the Solitary Tract that do and do not project to the Parabrachial pons. *Journal of Neurophysiology*, 74 (1), 249-257.
- MORDES, J.P., EL LOZY, M., HERRERA, M.G. Y SILEN, W. (1979). Effects of vagotomy with and without pyloroplasty on weight and food intake in rats. *Am. J. Physiol.*, Jan; 236(1): R61-6
- MORGAN, J.I. Y CURRAN, T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu. Rev. Neurosci.*, 14, 421-451.
- MORGANE, P.J. (1961). Alterations in feeding and drinking behavior of rats with lesions in globi pallidi. *The American journal of physiology*, Sep; 201; p. 420-8
- MORGANE, P.J. Y KOSMAN, A.J. (1957). Alterations in feline behaviour following bilateral amygdalotomy. *Nature*, Sep 21; 180(4586); p. 598-600
- MORRIS, R., FREY, S., KASAMBIRA, T. AND PETRIDES, M. (1999). Ibotenic acid lesions of the basolateral, but not the central, amygdala interfere with conditioned taste aversion: evidence from a combined behavioral and anatomical tract-tracing investigation. *Behav. Neurosci.*, 113(2), 291-302.
- MOUFID-BELLANCOURT, S. Y VELLELY, L. (1994). Effects of morphine injection into the parabrachial area on saccharin preference: modulation by lateral hypothalamic neurons. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, May; 48(1): 127-33
- MOUFID-BELLANCOURT, S., RAZAFIMANALINA, R. Y VELLELY, L. (1996). Interaction between mu and kappa receptors located in the parabrachial area in the opioid control of preference threshold for saccharin: modulatory role of lateral hypothalamic neurones. *Behavioural Pharmacology*, Dec; 7(8); p. 798-809
- MUCHA, R.F. (1987). Is the motivational effect of opiate withdrawal reflected by common somatic indices of precipitated withdrawal? A place conditioning study in the rat. *Brain Res.*, Aug 25; 418(2): 214-20
- MUCHA, R.F., MILLAN, M.J. Y HERZ, A. (1985). Aversive properties of naloxone in non-dependent (naïve) rats may involve blockade of central beta-endorphin. *Psychopharmacology (Berl)*, 86(3): 281-5
- MUCHA, R.F., VAN DER KOOY, D., O'SHAUGHNESSY, M. Y BUCENIEKS, P. (1982). Drug reinforcement studied by the use of place conditioning in rat. *Brain Res.*, Jul 8; 243(1): 91-105.
- MURRAY, A.M., RYOO, H.L., GUREVICH, E. Y JOYCE, J.N. (1994). Localization of dopamine D3 receptors to mesolimbic and D2 receptors to mesostriatal regions of human forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Nov 8; 91(23): 11271-5.
- NACHMAN, M. Y ASHE, J. (1974). Effects of basolateral amigdala lesions on neophobia learned taste aversions and sodium appetite in rats. *J. of Comp. And Physiol. Psychol.*, 87(4), 622-643.
- NADER, K. Y VAN DER KOOY, D. (1994). The Motivation Produced by Morphine and Food is Isomorphic: Approaches to Specific Motivational Stimuli Are Learned. *Psychobiology*, 22 (1), 68-76.
- NADER, K., BECHARA, A. Y VAN DER KOOY, D. (1996). Lesions of the lateral parabrachial nucleus block the aversive motivational effects of both morphine and morphine withdrawal but spare morphine's discriminative properties. *Behav. Neurosci.*, Dec; 110(6): 1496-502.
- NADER, K., BECHARA, A. Y VAN DER KOOY, D. (1997). Neurobiological Constraints on Behavioral Models of Motivation. *Annu. Rev. Psychol.*, 48, 85-114.
- NAKAGAWA, T., KATSUYA, A., TANIMOTO, S., YAMAMOTO, J., YAMAUCHI, Y., MINAMI, M. Y SATOH, M. (2003). Differential patterns of c-fos mRNA expression in the amygdaloid nuclei induced by chemical somatic and visceral noxious stimuli in rats. *Neurosci. Lett.*, Jul 3; 344(3): 197-200.



- NAKAGAWA, T., YAMAMOTO, R., FUJIO, M., SUZUKI, Y., MINAMI, M., SATOH, M. Y KANEKO, S. (2005). Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis activated by the central nucleus of the amygdala in the negative affective component of morphine withdrawal in rats. *Neuroscience*, 134(1): 9-19
- NAKAHARA, D., ISHIDA, Y., NAKAMURA, M., FURUNO, N. Y NISHIMORI, T. (2001). Intracranial self-stimulation induces Fos expression in GABAergic neurons in the rat mesopontine tegmentum. *Neuroscience*, 106(3); p. 633-41
- NAKAHARA, D., ISHIDA, Y., NAKAMURA, M., KUWAHARA, I., TODAKA, K. Y NISHIMORI, T. (1999). Regional differences in desensitization of *c-Fos* expression following repeated self-stimulation of the medial forebrain bundle in the rat. *Neuroscience*, Mar; 90(3): 1013-20.
- NAKASHIMA, K., KATSUKAWA, H., SASAMOTO, K. Y NINOMIYA, Y. (2001). Behavioral taste similarities and differences among monosodium L-glutamate and glutamate receptor agonists in C57BL mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 47(2), 161-166.
- NARANJO, C.A., TREMBLAY, L.K. Y BUSTO, U.E. (2001). The role of the brain reward system in depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, May; 25(4): 781-823
- NARUSE, T., ASAMI, T. Y KOIZUMI, Y. (1988). Effects of naloxone and picrotoxin on diazepam- or pentobarbital-induced hyperphagia in nondeprived rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Nov; 31(3): 709-11
- NAVARRO, M., CARRERA, M.R., DEL ARCO, I., TRIGO, J.M., KOOB, G.F. Y RODRÍGUEZ DE FONSECA, F. (2004). Cannabinoid receptor antagonist reduces heroin self-administration only in dependent rats. *Eur. J. Pharmacol.*, Oct 6; 501(1-3): 235-7
- NAVARRO, M., CARRERA, M.R., FRATTA, W., VALVERDE, O., COSSU, G., FATTORE, L., CHOWEN, J.A., GOMEZ, R., DEL ARCO, I., VILLANUA, M.A., MALDONADO, R., KOOB, G.F. Y RODRÍGUEZ DE FONSECA, F. (2001). Functional interaction between opioid and cannabinoid receptors in drug self-administration. *J. Neurosci.*, Jul 15; 21(14): 5344-50
- NAVARRO, M., SPRAY, K.J., CUBERO, I., THIELE, T.E. Y BERNSTEIN, I.L. (2000). *C-fos* induction during conditioned taste aversion expression varies with aversion strength. *Brain Res.*, 887(2), 450-453.
- NICKLOUS, D.M. Y SIMANSKY, K.J. (2003). Neuropeptide FF exerts pro- and anti-opioid actions in the parabrachial nucleus to modulate food intake. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, Nov; 285(5): R1046-54
- NIEUWENHUYNS, R., GEERAEDTS, L.M. Y VEENING, J.G. (1982). The medial forebrain bundle of the rat. I. General introduction. *J. Comp. Neurol.*, Mar 20; 206(1): 49-81.
- NISHIJO, H., ONO, T., UWANO, T., KONDOH, T. Y TORII, K. (2000). Hypothalamic and amygdalar neuronal responses to various tastant solutions during ingestive behavior in rats. *J. Nutr.*, Apr; 130(4S SUPPL): 954S-9S.
- NOEL, M.B. Y WISE, R.A. (1995). Ventral tegmental injections of a selective mu or delta opioid enhance feeding in food-deprived rats. *Brain Res.*, Mar 6; 673(2): 304-12
- NOMURA, S., DING, Y.Q., KANEKO, T., LI, J.L. Y MIZUNO, N. (1996). Localization of mu-opioid receptor-like immunoreactivity in the central components of the vagus nerve: a light and electron microscope study in the rat. *Neuroscience*, Jul; 73(1); p. 277-86
- NORGREN, R. (1974). Gustatory afferents to ventral forebrain. *Brain Res.*, 81, 285-295.
- NORGREN, R. (1976). Taste pathways to hypothalamus and amygdala. *J. Comp. Neurol.*, Mar 1; 166(1): 17-30.
- NORGREN, R. Y LEONARD, C.M. (1973). Ascending central gustatory pathways. *J. Comp. Neurol.*, Jul 15; 150(2): 217-37
- NORGREN, R. Y PFAFFMANN, C. (1975). The pontine taste area in the rat. *Brain Res.*, Jun 20; 91(1): 99-117
- NORGREN, R. Y SMITH, G.P. (1988). Central distribution of subdiaphragmatic vagal branches in the rat. *J. Comp. Neurol.*, Jul 8; 273(2): 207-23
- NOVIN, D., ROGERS, R.C. Y HERRMAN, G. (1981). Visceral afferent and efferent connections in the brain. *Diabetol.*, 20, 331-336.
- O'DELL, L.E., SUSSMAN, A.N., MEYER, K.L. Y NEISEWANDER, J.L. (1999). Behavioral effects of psychomotor stimulant infusions into amygdaloid nuclei. *Neuropsychopharmacology*, Jun; 20(6): 591-602
- OGAWA, H. Y HAYAMA, T. (1984). Receptive fields of solitario-parabrachial relay neurons responsive to natural stimulation of the oral cavity in rats. *Exp. Brain Res.*, 54(2), 359-66.

- O'HARE, E.O., CLEARY, J., BARTZ, P.J., WELDON, D.T., BILLINGTON, C.J. Y LEVINE, A.S. (1997). Naloxone administration following operant training of sucrose/water discrimination in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, Feb; 129(3): 289-94
- OHMAN, L.E. Y JOHNSON, A.K. (1986). Lesions in lateral parabrachial nucleus enhance drinking to angiotensin II and isoproterenol. *The American journal of physiology*, Sep; 251 (3 Pt 2); p. R504-9
- OHMAN, L.E. Y JOHNSON, A.K. (1989). Brain stem mechanisms and the inhibition of angiotensin-induced drinking. *The American journal of physiology*, Jan; 256(1 Pt 2); p. R264-9.
- OLDS, J. Y MILNER, P.M. (1954). Positive Reinforcement Produced by Electrical Stimulation of Septal Area and Other Regions of Rat Brain. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, 47, 419-427.
- OLDS, M. E. Y FOBES, J. J. (1981). The Central Basis of Motivation: Intracranial Self-Stimulation Studies. *Ann. Rev. Psychol.*, 32, 523-574.
- OLDS, M.E. (1982). Reinforcing effects of morphine in the nucleus accumbens. *Brain Res.*, Apr 15; 237(2): 429-40
- OLMSTEAD, M.C. Y FRANKLIN, K.B. (1997a). The Development of a Conditioned Place Preference to Morphine: Effects of Lesions of Various CNS Sites. *Behavioral Neuroscience*, Vol.111, N°6, 1313-1323.
- OLMSTEAD, M.C. Y FRANKLIN, K.B. (1997b). The development of a conditioned place preference to morphine: effects of microinjections into various CNS sites. *Behavioral Neuroscience*, Dec; 111(6): 1324-34
- Onishi, B.K.A. Y Xavier, G.F. (2010). Contextual, but not auditory, fear conditioning is disrupted by neurotoxic selective lesion of the basal nucleus of amygdala in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, Feb; 93(2): 165-174
- OSSENKOPP, K.P. (1983). Taste aversion conditioned with Gamma radiation: attenuation by area postrema lesions in rats. *Behav. Brain Res.*, 7, 293-305.
- OTTERSEN, O.P. (1981). Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat with some observations in the cat. III. Afferents from the lower brain stem. *J. Comp. Neurol.*, 202(3): 335-356.
- OTTERSEN, O.P. (1982). Connections of the amygdala of the rat. IV: Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.*, 205(1), 30-48.
- PACKARD, M.G. Y McGAUGH, J.L. (1992). Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. *Behav. Neurosci.*, 106(3) : 439-46.
- PACKARD, M.G. Y McGAUGH, J.L. (1996). Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 65 (1), 65-72.
- PADEN, C.M., KRALL, S. Y LYNCH, W.C. (1987). Heterogeneous distribution and upregulation of mu, delta and kappa opioid receptors in the amygdala. *Brain Res.*, Aug 25; 418(2): 349-55.
- PALFAI, T., ARMSTRONG, D. Y COURTNEY, C.L. (1984). Effect of l-dopa or bromocriptine on feeding and motor behavior of rats with lesions in the globus pallidus. *Physiology & behavior*, Aug; 33(2); p. 283-9.
- PANAGIS, G., MILIARESSIS, E., ANAGNOSTAKIS, Y. Y SPYRAKI, C. (1995). Ventral pallidum self-stimulation: a moveable electrode mapping study. *Behav. Brain Res.*, Jun; 68(2): 165-72.
- PANAGIS, G., NOMIKOS, G.G. MILIARESSIS, E., CHERGUI, K., KASTELLAKIS, A., SVENSSON, T.H. Y SPYRAKI, C. (1997). Ventral pallidum self-stimulation induces stimulus dependent increase in *c-fos* expression in reward-related brain regions. *Neuroscience*, Mar; 77(1); p. 175-86
- PAPALEO, F., KIEFFER, B.L., TABARIN, A. Y CONTARINO, A. (2007). Decreased motivation to eat in mu-opioid receptor-deficient mice. *The European journal of neuroscience*, Jun; 25(11); p. 3398-405
- PAPAS, S. Y FERGUSON, A.V. (1990). Electrophysiological characterization of reciprocal connections between the parabrachial nucleus and the area postrema in the rat. *Brain research bulletin*, Apr; 24(4); p. 577-82
- PARADIS, S. Y CABANAC, M. (2004). Flavor aversion learning induced by lithium chloride in reptiles but not in amphibians. *Behavioural processes*, Jul 30; 67(1); p. 11-8.
- PARKER, L.A., MAIER, S., RENNIE, M. Y CREBOLDER, J. (1992). Morphine- and naltrexone-induced modification of palatability: analysis by the taste reactivity test. *Behav. Neurosci.*, Dec; 106(6): 999-1010
- PASCOE, J.P. Y KAPP, B.C. (1987). Some electrophysiological characteristics of insular cortex efferents to the amygdaloid central nucleus in awake rabbits. *Neurosci. Letters*, 78, 288-294.

- PAXINOS, G. Y WATSON, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd. Edic., Acad. Press., N.Y.
- PAXINOS, G. Y WATSON, C. (1996). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Compact Third Edition, San Diego, CA. Academic Press.
- PECIÑA, S. Y BERRIDGE, K.C. (1996). Brainstem mediates diazepam enhancement of palatability and feeding: microinjections into fourth ventricle versus lateral ventricle. *Brain Res.*, Jul 15; 727(1-2): 22-30
- PERROTTO, R.S. Y SCOTT, T.R. (1976). Gustatory neural coding in the pons. *Brain Res.*, Jul 9; 110(2): 283-300
- PERRY, W., ESPÓSITO, R.U. Y KORNETSKY, C. (1981). Effects of chronic naloxone treatment on brain-stimulation reward. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Feb; 14(2): 247-9
- PETERS, J.C. Y HARPER, A.E. (1987). Acute effects of dietary protein on food intake, tissue amino acids, and brain serotonin. *The American journal of physiology*, May; 252(5 Pt 2); p. R902-14
- PETERS, J.H, RITTER, R.C., SIMASKO, S.M. (2006). Leptin and CCK selectively activate vagal afferent neurons innervating the stomach and duodenum. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 290: R1544-R1549.
- PETROV, T., KRUKOFF, T.L. Y JHAMANDAS, J.H. (1992a). The hypothalamic paraventricular and lateral parabrachial nuclei receive collaterals from raphe nucleus neurons: a combined double retrograde and immunocytochemical study. *J. Comp. Neurol.*, Apr 1; 318(1): 18-26.
- PETROV, T., JHAMANDAS, J.H. Y KRUKOFF, T.L. (1992b). Characterization of peptidergic efferents from the lateral parabrachial nucleus to identified neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *J. Chem. Neuroanat.*, Sep-Oct; 5(5): 367-73
- PETROVICH, G.D. Y SWANSON, L.W. (1997). Projections from the lateral part of the central amygdalar nucleus to the postulated fear conditioning circuit. *Brain research*, Jul 25; 763(2); p. 247-54.
- PHILLIPS A.G. (1984). Brain Reward Circuitry : a case for separate systems. *Brain Research Bulletin*, 12: 195-201.
- PHILLIPS A.G., AHN S. Y HOWLAND J.G. (2003). Amygdalar control of the mesocorticolimbic dopamine system: parallel pathways to motivated behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 27: 543-554
- PHILLIPS, A.G. Y FIBIGER, H.C. (1973). Dopaminergic and noradrenergic substrates of positive reinforcement: differential effects of d- and l-amphetamine. *Science*, 9; 179(73): 575-7.
- PHILLIPS, A.G. Y FIBIGER, H.C. (1978). The role of dopamine in maintaining intracranial self-stimulation in the ventral tegmentum, nucleus accumbens, and medial prefrontal cortex. *Can. J. Psychol.*, 32(2): 58-66.
- PHILLIPS, A.G. Y FIBIGER, H.C. (1989). Neuroanatomical bases of intracranial self-stimulation: untangling the Gordian knot. In: Lieberman, J.M. y Cooper, S.J. *The Neuropharmacological Basis of Reward*, (Cap. 3, pp. 66-105), Oxford University Press.
- PHILLIPS, A.G. Y LE PIANE, F.G. (1980). Reinforcing effects of morphine microinjection into the ventral tegmental area. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Jun; 12(6): 965-8
- PHILLIPS, A.G. Y LE PIANE, F.G. (1982). Reward produced by microinjection of (D-Ala<sup>2</sup>),Met<sup>5</sup>-enkephalinamide into the ventral tegmental area. *Behav. Brain Res.*, 5(2): 225-9.
- PHILLIPS, A.G., BROOKE, S.M. Y FIBIGER, H.C. (1975). Effects of amphetamine isomers and neuroleptics on self-stimulation from the nucleus accumbens and dorsal noradrenergic bundle. *Brain Res.*, 21; 85(1): 13-22.
- PHILLIPS, R.J. Y POWLEY, T.L. (1998). Gastric volume detection after selective vagotomies in rats. *Am. J. Physiol.*, Jun; 274(6 Pt 2): R1626-38
- PICH, E., LORANG, M., YEGANEH, M., RODRÍGUEZ DE FONSECA, F., RABER, J., KOOB, G.F. Y WEISS, F. (1995). Increase of extracellular corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity levels in the amygdala of awake rats during restraint stress and ethanol withdrawal as measured by microdialysis. *J. Neurosci.*, Aug; 15(8): 5439-47.
- PITKÄNEN, A., SAVANDER, V. Y LeDOUX, J.E. (1997). Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends in Neurosci.*, 20(11), 517-523.
- PITTMAN, Q.J., HATTON, J.D. Y BLOOM, F.E. (1980). Morphine and opioid peptides reduce paraventricular neuronal activity: studies on the rat hypothalamic slice preparation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Sep; 77(9): 5527-31

- POMONIS, J.D., JEWETT, D.C., KOTZ, C.M., BRIGGS, J.E., BILLINGTON, C.J. Y LEVINE, A.S. (2000). Sucrose consumption increases naloxone-induced c-Fos immunoreactivity in limbic forebrain. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, Mar; 278(3): R712-9
- POMONIS, J.D., LEVINE, A.S. Y BILLINGTON, C.J. (1997). Interaction of the hypothalamic paraventricular nucleus and central nucleus of the amygdala in naloxone blockade of neuropeptide Y-induced feeding revealed by *c-fos* expression. *J. Neurosci.*, Jul 1; 17(13): 5175-82
- POSADAS-ANDREWS, A., NIETO, J. Y BURTON, M.J. (1983). Chlordiazepoxide induced eating: hunger or voracity? *Proc. West Pharmacol. Soc.*, 26: 409-12
- POWELL, T.P., COWAN, W.M. Y RAISMAN, G. (1965). The central olfactory connexions. *J. of Anatomy*, 99(4), 791-813.
- PRICE, J.L. (1990). Olfactory System. En Paxinos, G., *The Human Nervous System*, Ed. Academic Press, 979-998.
- PUBOLS, L.M. (1966). Changes in food-motivated behavior of rats as a function of septal and amygdaloid lesions. *Experimental neurology*, Jun; 15(2); p. 240-54.
- PUERTO, A., DEUTSCH, J.A., MOLINA, F. Y ROLL, P.L. (1976). Rapid discrimination of rewarding nutrient by the upper gastrointestinal tract. *Science*, Apr 30; 192(4238): 485-7.
- QUIRK, G.J., ARMONY, J.L. Y LeDOUX, J.E. (1997). Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. *Neuron*, 19(3), 613-124.
- RABIN, B.M. Y HUNT, W.A. (1983). Effects of antiemetics on the acquisition and recall of radiation- and lithium chloride-induced conditioned taste aversions. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 18(4), 629-35.
- RABIN, B.M., HUNT, W.A. Y LEE, J. (1985). Intragastric copper sulfate produces a more reliable conditioned taste aversion in vagotomized rats than in intact rats. *Behav. Neural Biol.*, 44(3), 364-73.
- RABIN, B.M., JOSEPH, J.A., SHUKITT-HALE, B. Y McEWEN, J. (2000). Effects of exposure to heavy particles on a behavior mediated by the dopaminergic system. *Adv. Space Res.*, 25(19), 2065-2074.
- RABIN, B.M., SHUKITT-HALE, B., SZPRENGIEL, A. Y JOSEPH, J.A. (2002). Effects of heavy particle irradiation and diet on amphetamine- and lithium chloride-induced taste avoidance learning in rats. *Brain Res.*, 953(1-2): 31-36.
- RADA, P.V., MARK, G.P., YEOMANS, J.J. Y HOEBEL, B.G. (2000). Acetylcholine Release in Ventral Tegmental Area by Hypothalamic Self-Stimulation, Eating, and Drinking. *Pharmacol., Bio. & Behavior*, 65 (3), 375-379.
- RASSNICK, S., HEINRICHS, S.C., BRITTON, K.T. Y KOOB, G.F. (1993). Microinjection of a corticotropin-releasing factor antagonist into the central nucleus of the amygdala reverses anxiogenic-like effects of ethanol withdrawal. *Brain Res.*, Mar 5; 605(1): 25-32.
- RATCLIFFE, J.M., FENTON, M.B. Y GALEF, B.G. (2003). An exception to the rule: common vampire bats do not learn taste aversions. *Animal Behaviour*, 65: 385-389.
- RAYBOULD, H.E. Y TACHÉ, Y. (1989). Capsaicin-sensitive vagal afferent fibers and stimulation of gastric acid secretion in anesthetized rats. *Eur. J. Pharmacol.*, Aug 22; 167(2): 237-43
- REID, L.D. (1985). Endogenous opioid peptides and regulation of drinking and feeding. *The American journal of clinical nutrition*, Nov; 42(5 Suppl); p. 1099-132
- REIDELBERGER, R.D. Y O'ROURKE, M.F. (1989). Potent cholecystokinin antagonist L 364718 stimulates food intake in rats. *The American journal of physiology*, Dec; 257(6 Pt 2); p. R1512-8
- REILLY, S. (1999). The parabrachial nucleus and conditioned taste aversion. *Brain Res. Bull.*, Feb; 48(3): 239-54
- REILLY, S. Y BORNOVALOVA, M.A. (2005). Conditioned taste aversion and amygdala lesions in the rat: a critical review. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 29(7); p. 1067-88
- REILLY, S. Y TRIFUNOVIC, R. (2000a). Lateral parabrachial nucleus lesions in the rat: long- and short-duration gustatory preference tests. *Brain Res. Bull.*, Jan 15; 51(2): 177-86
- REILLY, S. Y TRIFUNOVIC, R. (2000b). Lateral parabrachial nucleus lesions in the rat: aversive and appetitive gustatory conditioning. *Brain Res. Bull.*, Jul 1; 52(4): 269-78
- REILLY, S. Y TRIFUNOVIC, R. (2001). Lateral parabrachial nucleus lesions in the rat: neophobia and conditioned taste aversion. *Brain Res. Bull.*, Jun; 55(3): 359-66

- REILLY, S., GRIGSON, P. S. Y NORGRÉN, R. (1993). Parabrachial Nucleus Lesions and Conditioned Taste Aversion: Evidence Supporting an Associative Deficit. *Behavioral Neuroscience*, 107 (6), 1005-1017.
- REN, K., BLASS, E.M., ZHOU, Q. Y DUBNER, R. (1997). Suckling and sucrose ingestion suppress persistent hyperalgesia and spinal Fos expression after forepaw inflammation in infant rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Feb 18; 94(4); p. 1471-5
- REYNOLDS, S.M. Y BERRIDGE, K.C. (2002). Positive and negative motivation in nucleus accumbens shell: bivalent rostrocaudal gradients for GABA-elicited eating, taste "liking"/"disliking" reactions, place preference/avoidance, and fear. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, Aug 15; 22(16); p. 7308-20
- REZAYOF, A., ZARRINDAST, M.R., SAHRAEI, H. Y HAERI-ROHANI, A.H. (2002). Involvement of dopamine D2 receptors of the central amygdala on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Dec; 74(1): 187-97.
- RICHARDSON, D.K., REYNOLDS, S.M., COOPER, S.J. Y BERRIDGE, K.C. (2005). Endogenous opioids are necessary for benzodiazepine palatability enhancement: naltrexone blocks diazepam-induced increase of sucrose-'liking'. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Jul; 81(3): 657-63.
- RICHE, D., DE POMMERY, J. Y MENETREY, D. (1990). Neuropeptides and catecholamines in efferent projections of the nuclei of the solitary tract in the rat. *J. Comp. Neurol.*, Mar 15; 293(3): 399-424
- RILLEY, S., GRIGSON, P. Y NORGRÉN, R. (1993). Parabrachial nucleus lesions and conditioned taste aversion: evidence supporting an associative deficit. *Behavioral Neurosci.*, 107(6), 1005-1017.
- RINAMAN, L., BAKER, E.A., HOFFMAN, G.E., STRICKER, E.M. Y VERBALIS, J.G. (1998). Medullary c-Fos activation in rats after ingestion of a satiating meal. *The American journal of physiology*, Jul; 275(1 Pt 2); p. R262-8
- RINAMAN, L., STRICKER, E.M., HOFFMAN, G.E. Y VERBALIS, J.G. (1997). Central *c-fos* expression in neonatal and adult rats after subcutaneous injection of hypertonic saline. *Neuroscience*, 79(4), 1165-1175.
- RITTER, S. Y DINH, T.T. (1992). Age-related changes in capsaicin-induced degeneration in rat brain. *J. Comp. Neurol.*, Apr 1; 318(1): 103-16
- RITTER, S. Y HUTTON, B. (1995). Mercaptoacetate-induced feeding is impaired by central nucleus of the amygdala lesions. *Physiology & behavior*, Dec; 58(6); p. 1215-20
- RITTER, S., DINH, T.T. Y FRIEDMAN, M.I. (1994). Induction of Fos-like immunoreactivity (Fos-li) and stimulation of feeding by 2,5-anhydro-D-mannitol (2,5-AM) require the vagus nerve. *Brain Res.*, May 16; 646(1): 53-64
- RITTER, S., McGLONE, J.J. Y KELLEY, K.W. (1980). Absence of lithium-induced taste aversion after area postrema lesion. *Brain Res.*, 17, 201(2), 501-6.
- ROBBINS, T.W. Y EVERITT, B.J. (1996). Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr. Opin. Neurobiol.*, Apr; 6(2): 228-36
- ROBBINS, T.W. Y EVERITT, B.J. (1999). Drug addiction: bad habits add up. *Nature*, Apr 15; 398(6728); p. 567-70
- ROBBINS, T.W. Y EVERITT, B.J. (2002). Motivation and Reward. In: Squire, L.R.; Bloom, F.E.; McConnell, S.K.; Roberts, J.L.; Spitzer, N.C. and Zigmond, M.J. (Eds.). *Fundamental Neuroscience*, Second Edition, Academic Press, Cap. 43.
- ROBBINS, T.W., CADOR, M., TAYLOR, J.R. Y EVERITT, B.J. (1989). Limbic-striatal interactions in reward-related processes. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 13(2-3): 155-62.
- ROBERT, J.J., OROSCO, M., ROUCH, C., COHEN, Y. Y JACQUOT, C. (1991). Effects of dexfenfluramine and opioid peptides, alone or in combination, on food intake and brain serotonin turnover in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Apr; 38(4): 775-80
- ROBINSON, T.E. Y BERRIDGE, K.C. (2003). Addiction. *Annu. Rev. Psychol.*, 54: 25-53.
- ROCKWOOD, G.A. Y REID, L.D. (1982). Naloxone modifies sugar-water intake in rats drinking with open gastric fistulas. *Physiol. Behav.*, Dec; 29(6): 1175-8
- RODGERS, R.J., RICHARDS, C. Y PRECIOUS, J.I. (1984). Naloxone administration following brief exposure to novelty reduces activity and rearing in mice upon 24-h retest: a conditioned aversion? *Psychopharmacology*, 82(4); p. 322-6
- RODRÍGUEZ DE FONSECA, F. Y NAVARRO, M. (1998). Role of the limbic system in dependence on drugs. *Ann. Med.*, 30 (4): 397-405.

- RODRÍGUEZ DE FONSECA, F., CARRERA, M.R., NAVARRO, M., KOOB, G.F. Y WEISS, F. (1997). Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. *Science*, 27; 276(5321): 2050-4.
- RODRÍGUEZ DE FONSECA, F., RUBIO, P., MARTÍN-CALDERÓN, J.L., CAINE, S.B., KOOB, G.F. Y NAVARRO, M. (1995). The dopamine receptor agonist 7-OH-DPAT modulates the acquisition and expression of morphine-induced place preference. *Eur. J. Pharmacol.*, Feb 14; 274(1-3): 47-55
- ROGAN, M.T. Y LeDOUX, J.E. (1995). LTP is accompanied by commensurate enhancement of auditory-evoked responses in a fear conditioning circuit. *Neuron*, 15(1), 127-136.
- ROLDAN, G. Y BURES, J. (1994). Tetrodotoxin blockade of amygdala overlapping with poisoning impairs acquisition of conditioned taste aversion in rats. *Behavioural brain research*, Dec 15; 65(2); p. 213-9.
- ROLLINS, B.L. Y KING, B.M. (2000). Amygdala-lesion obesity: what is the role of the various amygdaloid nuclei? *American journal of physiology: Regulatory, integrative and comparative physiology*, Oct; 279(4); p. R1348-56
- ROLLINS, B.L., STINES, S.G., MCGUIRE, H.B. Y KING, B.M. (2001). Effects of amygdala lesions on body weight, conditioned taste aversion, and neophobia. *Physiology & behavior*, Apr; 72(5); p. 735-42
- ROLLINS, B.L., STINES, S.G. Y KING, B.M. (2006). Role of the stria terminalis in food intake and body weight in rats. *Physiology & behavior*, Sep 30; 89(2); p. 139-45.
- ROLLS, E.T. Y ROLLS, B.J. (1973). Altered food preferences after lesions in the basolateral region of the amygdala in the rat. *Journal of comparative and physiological psychology*, May; 83(2); p. 248-59
- ROLLS, E.T., CRITCHLEY, H.D., BROWNING, A. Y HERNADI, I. (1998). The neurophysiology of taste and olfaction in primates, and umami flavor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, Nov 30; 855: 426-37
- ROMANSKI, L.M. Y LeDOUX, J.E. (1992). Equipotentiality of thalamo-amygdala and thalamo-cortico-amygdala circuits in auditory fear conditioning. *J. Neurosci.*, 12(11), 4501-4509.
- ROSSETTI, Z.L., MELIS, F., CARBONI, S., DIANA, M. Y GESSA, G.L. (1992). Alcohol withdrawal in rats is associated with a marked fall in extraneuronal dopamine. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, Jun; 16(3): 529-32
- ROUTTENBERG, A. (1976). Self-Stimulation Pathways: Origins and Termination -a three stage technique-. En: Wauquier, A. & Rolls, E. T. (Eds): *Brain Stimulation Reward*, North-Holland Publ. Comp., Cap. 2.
- ROWLAND, N.E. (1990). Sodium appetite. En E.D. Capaldi & T.L. Powley (Eds.), *Taste, experience, and feeding (pp. 94-104)*, Washington, DC: American Psychological Association.
- ROWLAND, N.E. (1994). Tolerance to the anorectic effect of dexfenfluramine in rats: role of serotonin, cholecystokinin, and neuropeptide Y. *Physiol. Behav.*, Feb; 55(2): 201-7
- ROWLAND, N.E., ROTH, J.D., McMULLEN, M.R., PATEL, A. Y CESPEDES, A.T. (2000). Dexfenfluramine and norfenfluramine: comparison of mechanism of action in feeding and brain Fos-ir studies. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, Feb; 278(2): R390-9
- ROZIN, P.N. Y SHULKIN, J. (1990). Food selection. En E.M. Stricker (Ed.), *Handbook of behavioral neurobiology (pp. 297-328)*, New York: Plenum Press.
- RUDSKI, J.M., BILLINGTON, C.J. Y LEVINE, A.S. (1997). A sucrose-based maintenance diet increases sensitivity to appetite suppressant effects of naloxone. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Nov; 58(3): 679-82
- RUSINIAC, K.W., HANKINS, W.G., GARCIA, J. Y BRET'T, L.P. (1979) Flavor-illness aversions: potentiation of odor by taste in rats. *Behavioral and neural biology*, Jan; 25(1); p. 1-17
- SAGAR, S.M., SHARP, F.R. Y CURRAN, T. (1988). Expression of *c-fos* protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*, 240(4857), 1328-1331.
- SAKAGUCHI, T. Y YAMAZAKI, M. (1986). Changes in water intake following hepatic vagotomy in young rats. *J. Auton. Nerv. Syst.*, Nov; 17(3): 243-6
- SAKAI, N. Y YAMAMOTO, T. (1997). Conditioned taste aversion and *c-fos* expression in the rat brainstem after administration of various USs. *Neuroreport*, Jul 7; 8(9-10): 2215-20.
- SAKAI, N. Y YAMAMOTO, T. (1998). Role of the medial and lateral parabrachial nucleus in acquisition and retention of conditioned taste aversion in rats. *Behav. Brain Res.*, Jun; 93(1-2): 63-70
- SAKAI, N. Y YAMAMOTO, T. (1999). Possible routes of visceral information in the rat brain in formation of conditioned taste aversion. *Neurosci. Res.*, Oct; 35(1): 53-61
- SALAMONE, J.D. (1994). The involvement of nucleus accumbens dopamine in appetitive and aversive motivation. *Behav. Brain Res.*, Apr 18; 61(2): 117-33

- SALEH, T.M. Y CECCHETTO, D.F. (1993). Peptides in the parabrachial nucleus modulate visceral input to the thalamus. *Am. J. Physiol.*, Apr; 264(4 Pt 2): R668-75
- SALES, N., RICHE, D., ROQUES, B.P. Y DENAVIT-SAUBIE, M. (1985). Localization of mu- and delta-opioid receptors in cat respiratory areas: an autoradiographic study. *Brain research*, Oct 7; 344(2); p. 382-6
- SANANES, C.B. Y CAMPBELL, B.A. (1989). Role of the central nucleus of the amygdala in olfactory heart rate conditioning. *Behav. Neurosci.*, 103(3), 519-525.
- SANANES, C.B. Y DAVIS, M. (1992). N-methyl-D-aspartate lesions of the lateral and basolateral nuclei of the amygdala block fear-potentiated startle and shock sensitization of startle. *Behav. Neurosci.*, Feb; 106(1): 72-80.
- SAPER, C.B. (1995). The spinoparabrachial pathway: shedding new light on an old path. *J. Comp. Neurol.*, Mar 20; 353(4): 477-9
- SAPER, C.B. Y LOEWY, A.D. (1980). Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res.*, 197, 291-317.
- SCALIA, F. Y WINANS, S.S. (1975). The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J. of Comp. Neurobiol.*, 161(1), 31-55.
- SCHAEFER, G.J. (1988). Opiate antagonists and rewarding brain stimulation. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, Spring; 12(1): 1-17
- SCHAEFER, G.J. Y MICHAEL, R.P. (1981). Threshold differences for naloxone and naltrexone in the hypothalamus and midbrain using fixed ratio brain self-stimulation in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 74(1): 17-22
- SCHAEFER, G.J. Y MICHAEL, R.P. (1985). Effects of opioid antagonists and their quaternary derivatives on locomotor activity and fixed ratio responding for brain self-stimulation in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Nov; 23(5): 797-802
- SCHAEFER, G.J. Y MICHAEL, R.P. (1986). Changes in response rates and reinforcement thresholds for intracranial self-stimulation during morphine withdrawal. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Dec; 25(6): 1263-9
- SCHAEFER, G.J. Y MICHAEL, R.P. (1988). Naloxone and diprenorphine reduce responding for brain self-stimulation in a fixed-ratio schedule in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Jan; 29(1): 209-12
- SCHAEFFER, L.A., KOCH, J.E. Y BODNAR, R.J. (1994). Naltrexone, Dopamine Receptor Agonists and Antagonists, and Food Intake in Rats: 2,2-Deoxy-D-Glucose. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 49 (1), 205-211.
- SCHAFE, G.E. Y BERNSTEIN, I.L. (1996). Forebrain contribution to the induction of a brainstem correlate of conditioned taste aversion: I. The amygdala. *Brain Res.*, 741(1-2), 109-16
- SCHAFE, G.E., THIELE, T.E. Y BERNSTEIN, I.L. (1998). Conditioning method dramatically alters the role of amygdala in taste aversion learning. *Learn. Mem.*, 5(6), 481-492.
- SCHECHTER, M.D. Y CALCAGNETTI, D.J. (1998). Continued trends in the conditioned place preference literature from 1992 to 1996, inclusive, with a cross-indexed bibliography. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, Oct; 22(6); p. 827-46.
- SCHOENBAUM, G.M., MARTIN, R.J. Y ROANE, D.S. (1990). Discontinuation of sustained sucrose-feeding aggravates morphine withdrawal. *Brain research bulletin*, Apr; 24(4); p. 565-8
- SCHOENFELD, T.A. Y HAMILTON, L.W. (1981). Disruption of appetite but not hunger or satiety following small lesions in the amygdala of rats. *Journal of comparative and physiological psychology*, Aug; 95(4); p. 565-87
- SCHULTEIS, G., MARKOU, A., GOLD, L.H., STINUS, L. Y KOOB, G.F. (1994). Relative sensitivity to naloxone of multiple indices of opiate withdrawal: a quantitative dose-response analysis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Dec; 271(3): 1391-8
- SCHWARTZ, G.J. (2000). The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition*, Oct; 16(10): 866-73
- SCHWARTZ, G.J. (2002). Neural-immune gut-brain communication in the anorexia of disease. *Nutrition*, Jun; 18(6): 528-33
- SCHWARTZ, G.J. Y MORAN, T.H. (1996). Sub-diaphragmatic vagal afferent integration of meal-related gastrointestinal signals. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 20(1): 47-56

- SCHWARTZ, G.J., SALORIO, C.F., SKOGLUND, C. Y MORAN, T.H. (1999). Gut vagal afferent lesions increase meal size but do not block gastric preload-induced feeding suppression. *Am. J. Physiol.*, Jun; 276(6 Pt 2): R1623-9
- SCHWARTZ, N.B. Y KLING, A. (1964). The effect of amygdaloid lesions on feeding, grooming and reproduction in rats. *Acta neurovegetativa*, 26; p. 12-34
- SCHWARZ-STEVENSON, K.S., FILES, F.J. Y SAMSON, H.H. (1992). Effects of morphine and naloxone on ethanol- and sucrose-reinforced responding in nondeprived rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, Aug; 16(4): 822-32
- SCIBILIA, R.J., LACHOWICZ, J.E. Y KILTS, C.D. (1992). Topographic nonoverlapping distribution of D1 and D2 dopamine receptors in the amygdaloid nuclear complex of the rat brain. *Synapse*, Jun; 11(2): 146-54
- SCLAFANI, A. (1995). How food preferences are learned: laboratory animal models. *Proc. Nutr. Soc.*, Jul; 54(2): 419-27
- SCLAFANI, A. Y KRAMER, T.H. (1983). Dietary selection in vagotomized rats. *J. Auton. Nerv. Syst.*, Oct; 9(1): 247-58
- SCLAFANI, A., AZZARA, A.V., TOUZANI, K., GRIGSON, P.S. Y NORNGREN, R. (2001). Parabrachial nucleus lesions block taste and attenuate flavor preference and aversion conditioning in rats. *Behav. Neurosci.*, Aug; 115(4): 920-33
- SCLAFANI, A., BELLUZZI, J.D. Y GROSSMAN, S.P. (1970). Effects of lesions in the hypothalamus and amygdala on feeding behavior in the rat. *Journal of comparative and physiological psychology*, Sep; 72(3); p. 394-403.
- SEE, R.E., McLAUGHLIN, J. Y FUCHS, R.A. (2003). Muscarinic receptor antagonism in the basolateral amygdala blocks acquisition of cocaine-stimulus association in a model of relapse to cocaine-seeking behavior in rats. *Neuroscience*, 117(2): 477-83.
- SEELEY, R.J. Y WOODS, S.C. (2003). Monitoring of stored and available fuel by the CNS: implications for obesity. *Nat. Rev. Neurosci.*, Nov; 4(11): 901-9
- SELF, D.W. Y NESTLER, E.J. (1995). Molecular Mechanisms of Drug Reinforcement and Addiction. *Annu. Rev. Neurosci.*, 18, 463-495.
- SEWARDS, T.V. (2004). Dual separate pathways for sensory and hedonic aspects of taste. *Brain research bulletin*, Jan 15; 62(4); p. 271-83
- SEWARDS, T.V. Y SEWARDS, M.A. (2001). Cortical association areas in the gustatory system. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, Jul; 25(5): 395-407
- SHAHAM, Y., RAJABI, H. Y STEWART, J. (1996). Relapse to heroin-seeking in rats under opioid maintenance: the effects of stress, heroin priming, and withdrawal. *J. Neurosci.*, Mar 1; 16(5): 1957-63
- SHAPIRO, R.E. Y MISELIS, R.R. (1985). The central organization of the vagus nerve innervating the stomach of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 238(4): 473-488.
- SHARKEY, K.A. (1987). The organization of capsaicin-sensitive visceral afferent systems. *Acta Physiol. Hung.*, 69(3-4): 447-58
- SHARP, F.R., SAGAR, S.M., HICKS, K., LOWENSTEIN, D. Y HISANAGA, K. (1991). *c-fos* mRNA, Fos, and Fos-related antigen induction by hypertonic saline and stress. *J. Neurosci.*, 11(8), 2321-2331.
- SHAW, N.A. (1988). Disruption of conditioned taste aversion: evidence that ECS weakens the gustatory engram. *Behavioral and Neural Biol.*, 49, 302-312.
- SHIDE, D.J. Y BLASS, E.M. (1991). Opioid mediation of odor preference induced by sugar and fat in 6-day-old rat. *Physiology and Behavior*, 50: 961-966.
- SHIPLEY, M.T. Y GEINISMAN, Y. (1984). Anatomical evidence for a convergence of olfactory, gustatory and visceral afferent pathways in mouse cerebral cortex. *Brain Res. Bull.*, 12, 221-226.
- SHIPPENBERG, T.S. Y ELMER, G.I. (1998). The Neurobiology of Opiate Reinforcement. *Critical Rev. Neurobiol.*, 12 (4), 267-303.
- SHIPPENBERG, T.S., BALS-KUBIK, R. Y HERZ, A. (1993). Examination of the Neurochemical Substrates Mediating the Motivational Effects of Opioids: Role of the Mesolimbic Dopamine System and D-1 Vs. D-2 Dopamine Receptors. *The J. of Pharmacol. & Exp. Therap.*, 265 (1), 53-59.
- SHIPPENBERG, T.S., BALS-KUBIK, R. Y HERZ, A. (1987). Motivational properties of opioids: evidence that an activation of delta-receptors mediates reinforcement processes. *Brain Res.*, Dec 15; 436(2): 234-9.



- SHIPPENBERG, T.S., HEIDBREDE, C. Y LEFEVOUR, A. (1996). Sensitization to the conditioned rewarding effects of morphine: pharmacology and temporal characteristics. *Eur. J. Pharmacol.*, 28; 299 (1-3): 33-9.
- SHOBI, V. Y GOEL, H.C. (2001). Protection against radiation-induced conditioned taste aversion by *Centella asiatica*. *Physiol. Behav.*, 73 (1-2), 19-23.
- SHOBLOCK, J.R. Y MAIDMENT, N.T. (2006). Constitutively active micro opioid receptors mediate the enhanced conditioned aversive effect of naloxone in morphine-dependent mice. *Neuropsychopharmacology*, Jan; 31(1): 171-7
- SHUKITT-HALE, B., CASADESUS, G., McEWEN, J.J., RABIN, B.M. Y JOSEPH, J.A. (2000). Spatial learning and memory deficits induced by exposure to iron-56-particle radiation. *Radiat. Res.*, 154(1), 28-33.
- SIMBAYI, L.C. (1987). Effects of anterior basolateral amygdala lesions on taste aversions produced by high and low oral doses of LiCl and lactose in the rat. *Behav. Brain Res.*, 25(2), 131-142.
- SIMBAYI, L.C., BOAKES, R.A. Y BURTON, M.J. (1986). Effects of basolateral amygdala lesions on taste aversions produced by lactose and lithium chloride in the rat. *Behav. Neurosci.*, 100(4), 455-465.
- SIMANSKY, K.J. Y NICKLOUS, D.M. (2002). Parabrachial infusion of D-fenfluramine reduces food intake. Blockade by the 5-HT(1B) antagonist SB-216641. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Apr; 71(4): 681-90
- SIMÓN, M.J. (2003). Efectos comportamentales de la activación del complejo parabraquial troncoencefálico: relevancia del subnúcleo lateral externo en el aprendizaje espacial y gustativo inducido por estimulación. *Tesis Doctoral*, Universidad de Granada.
- SIMÓN, M.J., GARCÍA, R., ZAFRA, M.A., MOLINA, F. Y PUERTO, A. (2007). Learned preferences induced by electrical stimulation of a food-related area of the parabrachial complex: effects of naloxone. *Neurobiology of learning and memory*, Mar; 87(3); p. 332-42.
- SIMÓN, M.J., GARCÍA, R., Y PUERTO, A. (2011). Concurrent stimulation-induced place preference in lateral hypothalamus and parabrachial complex: Differential effects of naloxone. *Behavioural Brain research*, Nov 20; 225(1): 311-316
- SIMPSON, S.J. Y RAUBENHEIMER, D. (1999). Assuaging nutritional complexity: a geometrical approach. *The Proceedings of the Nutrition Society*, Nov; 58(4); p. 779-89
- SINGH, J., DESIRAJU, T., NAGARAJA, T.N. Y RAJU, T.R. (1994). Facilitation of self-stimulation of ventral tegmentum by microinjection of opioid receptor subtype agonists. *Physiol. Behav.*, Apr; 55(4): 627-31.
- SINGH, R.B., PELLA, D., MECHIROVA, V. Y OTSUKA, K. (2004). Can brain dysfunction be a predisposing factor for metabolic syndrome? *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, Oct; 58 Suppl 1; p. S56-68
- SIVIY, S.M. Y REID, L.D. (1983). Endorphinergic modulation of acceptability of putative reinforcers. *Appetite*, Dec; 4(4): 249-57
- SKOUBIS, P.D., MATTHES, H.W., WALWYN, W.M., KIEFFER, B.L. Y MAIDMENT, N.T. (2001). Naloxone fails to produce conditioned place aversion in mu-opioid receptor knock-out mice. *Neuroscience*, 106(4): 757-63.
- SLUGG, R.M. Y LIGHT, A.R. (1994). Spinal cord and trigeminal projections to the pontine parabrachial region in the rat as demonstrated with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *J. Comp. Neurol.*, Jan 1; 339(1): 49-61
- SMITH, D.V., VAN BUSKIRK, R.L., TRAVERS, J.B. Y BIEBER, S.L. (1983). Gustatory neuron types in hamster brain stem. *Journal of neurophysiology*, Aug; 50(2); p. 522-40
- SMITH, G.P. (2000). The controls of eating: a shift from nutritional homeostasis to behavioral neuroscience. *Nutrition*, Oct; 16(10): 814-20
- SMITH, G.P. Y JEROME, C. (1983). Effects of total and selective abdominal vagotomies on water intake in rats. *J. Auton. Nerv. Syst.*, Oct; 9(1): 259-71
- SMITH, G.P., GIBBS, J., JEROME, C., PI-SUNYER, F.X., KISSILEFF, H.R. Y THORNTON, J. (1982). The satiety effect of cholecystokinin: a progress report. *Peptides*, 2 Suppl 2; p. 57-9
- SMITH, G.P., JEROME, C., CUSHIN, B.J., ETERNO, R. Y SIMANSKY, K.J. (1981). Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in the rat. *Science*, 213: 1036-1037.
- SMITH, J.F., PAYNE, E., PETERSON, A.J., MCGOWAN, L.T., COPE, B. Y McLAUGHLIN, R. (1990). Effects of phenobarbital, dietary protein intake, and ewe liveweight on ovulation rate and concentrations of plasma FSH and hepatic microsomal enzymes. *Reproduction, Fertility, and Development*, 2(6); P. 623-32

- SMITH, R., BESSER, G.M. Y REES, L.H. (1985). The effect of surgery on plasma beta-endorphin and methionine-enkephalin. *Neuroscience letters*, Mar 22; 55(1); p. 17-21
- SNOWDON, C.T. (1970). Gastrointestinal sensory and motor control of food intake. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, Apr; 71(1): 68-76
- SNOWDON, C.T. Y EPSTEIN, A.N. (1970). Oral and intragastric feeding in vagotomized rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, Apr; 71(1): 59-67
- SÖDERPALM, A.H. Y BERRIDGE, K.C. (2000). The hedonic impact and intake of food are increased by midazolam microinjection in the parabrachial nucleus. *Brain Res.*, Sep 22; 877(2): 288-97
- SOKOLOFF, P. Y SCHWARTZ, J.C. (1995). Novel dopamine receptors half a decade later. *Trends Pharmacol. Sci.*, Aug; 16(8): 270-5.
- SOKOLOWSKI, J.D., CONLAN, A.N. Y SALAMONE, J.D. (1998). A Microdialysis Study of Nucleus Accumbens Core and Shell Dopamine During Operant Responding in the Rat. *Neuroscience*, 86 (3), 1001-1009.
- SOLOMAN, S.M. Y KIRBY, D.F. (1990). The refeeding syndrome: A review. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 14, 90-97
- SORA, I., HALL, F.S., ANDREWS, A.M., ITOKAWA, M., LI, X.F., WEI, H.B., WICHEMS, C., LESCH, K.P., MURPHY, D.L. Y UHL, G.R. (2001). Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Apr 24; 98(9): 5300-5.
- SOUTH, E.H. Y RITTER, R.C. (1983). Overconsumption of preferred foods following capsaicin pretreatment of the area postrema and adjacent nucleus of the solitary tract. *Brain Res.*, Dec 12; 288(1-2): 243-51
- SPANAGEL, R. Y WEISS, F. (1999) The Dopamine Hypothesis of Reward: Past and Current Status. *TINS*, 22 (11), 521-527.
- SPANAGEL, R., HERZ, A. Y SHIPPENBERG, T.S. (1992). Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 2046-2050.
- SPECTOR, A.C. (2000). Linking gustatory neurobiology to behavior in vertebrates. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, Jun; 24(4); p. 391-416
- SPECTOR, A.C., NORNGREN, R. Y GRILL, H.J. (1992). Parabrachial gustatory lesions impair taste aversion learning in rats. *Behav. Neurosci.*, Feb; 106(1): 147-61
- SPITERI, T., LE PAPE, G. Y AGMO, A. (2000). What is Learned During Place Preference Conditioning?. A Comparison of Food- and Morphine- Induced Reward. *Psychobiology*, 28(3), 367-382.
- SPYRAKI, C., FIBIGER, H.C. Y PHILLIPS, A.G. (1983). Attenuation of heroin reward in rats by disruption of the mesolimbic dopamine system. *Psychopharmacology (Berl)*, 79(2-3): 278-83
- SQUIRE, L.R. Y COHEN, N.J. (1984). Human memory and amnesia. En Lynch, G., McGaugh, J.L. y Weinberger, N. (Eds.), *Neurobiology of Learning and Memory*, New York: Gilford Press.
- SRIPANIDKULCHAI, K., SRIPANIDKULCHAI, B. Y WYSS, J.M. (1984). The cortical projection of the basolateral amygdaloid nucleus in the rat: a retrograde fluorescent dye study. *J. Comp. Neurol.*, 229(3), 419-431.
- STANDAERT, D.G., WATSON, S.J., HOUGHTEN, R.A. Y SAPER, C.B. (1986). Opioid peptide immunoreactivity in spinal and trigeminal dorsal horn neurons projecting to the parabrachial nucleus in the rat. *J. Neurosci.*, May; 6(5): 1220-6
- STAPLETON, J.M., LIND, M.D., MERRIMAN, V.J. Y REID, L.D. (1979). Naloxone inhibits diazepam-induced feeding in rats. *Life Sci*, Jun 25; 24(26): 2421-5
- STEFURAK, T. L. Y VAN DER KOOY, D. (1994). Tegmental Pedunculopontine Lesions in Rats Decrease Saccharin's Rewarding Effects but not Its Memory-Improving Effect. *Behav. Neurosci.*, 108 (5), 972-980.
- STEIN, L. Y BELLUZZI, J.D. (1978). Brain endorphins and the sense of well-being: a psychobiological hypothesis. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 18: 299-311.
- STEINERT, P.A., INFURNA, R.N., JARDULA, M.F. Y SPEAR, N.E. (1979). Effects of CS concentration on long delay taste aversion learning in preweanling and adult rats. *Behav. and Neural Biol.*, 27, 487-502.
- STELLAR, J.R. Y CORBETT, D. (1989). Regional neuroleptic microinjections indicate a role for nucleus accumbens in lateral hypothalamic self-stimulation reward. *Brain Res.*, Jan 16; 477(1-2): 126-43.
- STEVENS, K.E., SHIOTSU, G. Y STEIN, L (1991). Hippocampal  $\mu$ -receptors mediate opioid reinforcement in the CA3 region. *Brain Res.*, 545, 8-16.

- STEVENSON, G.W., CANADAS, F., ZHANG, X., RICE, K.C. Y RILEY, A.L. (2000). Morphine discriminative control is mediated by the mu opioid receptor: assessment of delta opioid substitution and antagonism. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Aug; 66(4): 851-6.
- STINUS, L., CAILLE, S. Y KOOB, G.F. (2000). Opiate Withdrawal-Induced Place Aversion Lasts for Up To 16 Weeks. *Psychopharmacology*, 149, 115-120.
- STINUS, L., LE MOAL, M. Y KOOB, G.F. (1990). Nucleus accumbens and amygdala are possible substrates for the aversive stimulus effects of opiate withdrawal. *Neuroscience*, 37(3): 767-73.
- STOLERMAN, I.P. (1985). Motivational effects of opioids: evidence on the role of endorphins in mediating reward or aversion. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Nov; 23(5): 877-81.
- STOLERMAN, I.P. (1992). Drugs of Abuse: Behavioural Principles, Methods and Terms. *Trends in Pharmacological Sciences*, Vol.13,170-176.
- STOLLER, W.L. (1972). Effects of septal and amygdaloid lesions on discrimination, eating and drinking. *Physiology & behavior*, May; 8(5); p. 823-8.
- STORNETTA, R.L., NORTON, F.E. Y GUYENET, P.G. (1993). Autonomic areas of rat brain exhibit increased Fos-like immunoreactivity during opiate withdrawal in rats. *Brain Res.*, Oct 8; 624(1-2): 19-28.
- STRATFORD, T.R., HOLAHAN, M.R. Y KELLEY, A.E. (1997). Injections of nociceptin into nucleus accumbens shell or ventromedial hypothalamic nucleus increase food intake. *Neuroreport*, Jan 20; 8(2): 423-6
- SUEMORI, K., KOBASHI, M. Y ADACHI, A. (1994). Effects of gastric distension and electrical stimulation of dorsomedial medulla on neurons in parabrachial nucleus of rats. *Journal of the autonomic nervous system*, Aug; 48(3); p. 221-9
- SUN, N., ROBERTS, L. Y CASSELL, M.D. (1991). Rat central amygdaloid nucleus projections to the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain research bulletin*, Nov; 27(5); p. 651-62
- SURH, Y.J. Y LEE, S.S. (1995). Capsaicin, a double-edged sword: toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. *Life Sci.*, 56(22): 1845-55
- SWANK, M.W. (1999). Coordinate regulation of Fos and Jun proteins in mouse brain by LiCl. *Neuroreport*, Nov 26; 10(17): 3685-9.
- SWANK, M. Y BERNSTEIN, F.L. (1994). *C-fos* induction in response to a conditioned stimulus after single trial taste aversion learning. *Brain Res.*, 636, 202-208.
- SWANK, M.W., SCHAFF, G.E. Y BERNSTEIN, I.L. (1995). *C-fos* induction in response to taste stimuli previously paired with amphetamine or LiCl during taste aversion learning. *Brain Res.*, 673(2), 251-261.
- SWANSON, L.W. Y PETROVICH, G.D. (1998). What is the amygdala? *Trends Neurosci.*, Aug; 21(8): 323-31
- SWEET, D.C., LEVINE, A.S. Y KOTZ, C.M. (2004). Functional opioid pathways are necessary for hypocretin-1 (orexin-A)-induced feeding. *Peptides*, Feb; 25(2): 307-14
- SWITHERS, S.E. Y HALL, W.G. (1994). Does oral experience terminate ingestion? *Appetite*, Oct; 23(2): 113-38
- TAKAKI, A., NAGAI, K., TAKAKI, S., YANAIHARA, N. Y NAKAGAWA, H. (1990). Satiety function of neurons containing a CCK-like substance in the dorsal parabrachial nucleus. *Physiol. Behav.*, Dec; 48(6): 865-71
- TAKEMORI, A.E. Y PORTOGHESE, P.S. (1987). Evidence for the interaction of morphine with kappa and delta opioid receptors to induce analgesia in beta-funaltrexamine-treated mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Oct; 243(1): 91-4.
- TANAKA, J., HAYASHI, Y., YAMATO, K., MIYAKUBO, H. Y NOMURA, M. (2004). Involvement of serotonergic systems in the lateral parabrachial nucleus in sodium and water intake: a microdialysis study in the rat. *Neurosci. Lett.*, Feb 26; 357(1): 41-4
- TANDA, G. Y GOLDBERG, S.R. (2003). Cannabinoids: reward, dependence, and underlying neurochemical mechanisms--a review of recent preclinical data. *Psychopharmacology (Berl)*, Sep; 169(2): 115-34
- TASSIN, J.P. (1998). Drogas, Dependencia y Dopamina. *Mundo Científico*, 189, 98-73.
- TEHOVNIK, E.J. (1996). Electrical stimulation of neural tissue to evoke behavioral responses. *Journal of neuroscience methods*, Mar; 65(1), 1-17
- TERK, M.P. Y GREEN, L. (1980). Taste aversion learning in the bat, *Carollia perspicillata*. *Behavioral and neural biology*, Feb; 28(2); p. 236-42

- THIELE, T.E., KIEFER, S.W. AND BADIA-ELDER, N.E. (1996). Delayed generalization testing produces enhanced alcohol aversions in rats. *Alcohol*, 13(2), 201-207
- THIELE, T.E., CUBERO, I., VAN DIJK, G., MEDIAVILLA, C. Y BERNSTEIN, I.L. (2000). Etanol-induced *c-fos* expresión in catecholamine- and neuropeptide Y-producing neurons in rat brainstem. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 24(6), 802-809.
- THORNE, B.M., AARON, M. Y LATHAM, E.E. (1973). Effects of olfactory bulb ablation upon emotionality and muricidal behavior in four rat strains. *Journal of comparative and physiological psychology*, Aug; 84(2); p. 339-44
- TKACS, N.C. Y LI, J. (1999). Immune stimulation induces Fos expression in brainstem amygdala afferents. *Brain Res. Bull.*, Jan 15; 48(2): 223-31
- TOATES, F.M. (1981). The control of ingestive behaviour by internal and external stimuli—a theoretical review. *Appetite*, 2, 35-50
- TOLKAMP, B.J., DEWHURST, R.J., FRIGGENS, N.C., KYRIAZAKIS, I., VEERKAMP, R.F. Y OLDHAM, J.D. (1998). Diet choice by dairy cows. 1. Selection of feed protein content during the first half of lactation. *Journal of dairy science*, Oct; 81(10); p. 2657-69
- TOLKAMP, B.J., KYRIAZAKIS, I., OLDHAM, J.D., LEWIS, M., DEWHURST, R.J. Y NEWBOLD, J.R. (1998). Diet choice by dairy cows. 2. Selection for metabolizable protein or for ruminally degradable protein? *Journal of dairy science*, Oct; 81(10); p. 2670-80
- TORRAS, M., PORTELL, I. Y MORGADO, I. (2001). La amígdala: implicaciones funcionales. *Rev. Neurol.*, 33(5), 471-6.
- TORVIK, A. (1956). Afferent connections to the sensory trigeminal nuclei, the nucleus of the solitary tract and adjacent structures; an experimental study in the rat. *The Journal of comparative neurology*, Nov; 106(1); p. 51-141.
- TOUZANI, K. Y SCLAFANI, A. (2005). Critical role of amygdala in flavor but not taste preference learning in rats. *Eur. J. Neurosci.*, Oct; 22(7): 1767-74.
- TOUZANI, K. Y VELLELY, L. (1998). Electrical self-stimulation in the central amygdaloid nucleus after ibotenic acid lesion of the lateral hypothalamus. *Behav. Brain Res.*, Feb; 90(2): 115-24.
- TRAVERS, J.B. Y NORNGREN, R. (1986). Electromyographic analysis of the ingestion and rejection of sapid stimuli in the rat. *Behav. Neurosci.*, Aug; 100(4): 544-55
- TRAVERS, S.P. Y HU, H. (2000). Extranuclear projections of rNST neurons expressing gustatory-elicited Fos. *J. Comp. Neurol.*, Nov 6; 427(1): 124-38
- TRAVERS, S.P. Y NORNGREN, R. (1995). Organization of orosensory responses in the nucleus of the solitary tract of rat. *Journal of neurophysiology*, Jun; 73(6); p. 2144-62
- TRAVERS, S.P. Y SMITH, D.V. (1984). Responsiveness of neurons in the hamster parabrachial nuclei to taste mixtures. *J. Gen. Physiol.*, Aug; 84(2): 221-50
- TREIT, D. Y BERRIDGE, K.C. (1990). A comparison of benzodiazepine, serotonin, and dopamine agents in the taste-reactivity paradigm. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Nov; 37(3): 451-6.
- TRAVERS, S.P., PFAFFMAN, C. Y NORNGREN, R. (1986). Convergence of lingual and palatal gustatory neural activity in the nucleus of solitary tract. *Brain Res.*, 365, 305-320.
- TREIT, D. Y SPETCH, M.L. (1986). Caloric regulation in the rat: control by two factors. *Physiol. Behav.*, 36(2): 311-7
- TREIT, D., BERRIDGE, K.C. Y SCHULTZ, C.E. (1987). The direct enhancement of positive palatability by chlordiazepoxide is antagonized by Ro 15-1788 and CGS 8216. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Apr; 26(4): 709-14
- TRIFUNOVIC, R. Y REILLY, S. (2001). Medial versus lateral parabrachial nucleus lesions in the rat: effects on cholecystikinin- and D-fenfluramine-induced anorexia. *Brain Res.*, Mar 16; 894(2): 288-96
- TRIFUNOVIC, R. Y REILLY, S. (2002). Medial versus lateral parabrachial nucleus lesions in the rat: effects on mercaptoacetate-induced feeding and conditioned taste aversion. *Brain Res. Bull.*, May; 58(1): 107-13
- TRIFUNOVIC, R. Y REILLY, S. (2006). Medial parabrachial nucleus neurons modulate d-fenfluramine-induced anorexia through 5HT<sub>2C</sub> receptors. *Brain Res.*, Jan 5; 1067(1): 170-6
- TRUJILLO, K.A., BELLUZZI, J.D. Y STEIN, L. (1989a). Naloxone suppression of self-stimulation is independent of response difficulty. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, May; 33(1): 147-55.

- TRUJILLO, K.A., BELLUZZI, J.D. Y STEIN, L. (1989b). Effects of opiate antagonists and their quaternary analogues on nucleus accumbens self-stimulation. *Behav. Brain Res.*, Jun 1; 33(2): 181-8.
- TURNER, B.H. Y HERKENHAM, M. (1991). Thalamoamygdaloid projections in the rat: a test of the amygdala's role in sensory processing. *The Journal of comparative neurology*, Nov 8; 313(2); p. 295-325
- TZSCHENTKE, T.M. (1998). Measuring Reward with the Conditioned Place Preference Paradigm: A Comprehensive Review of Drug Effects, Recent Progress and New Issues. *Progress in Neurob.*, Vol.56, 613-672.
- UNNO, T., HASHIMOTO, M., ARAI, S. Y KUROSAWA, M. (2002). Reduction of food intake following X-ray irradiation of rats--involvement of visceral afferent nerves. *Auton. Neurosci.*, Mar 18; 96(2): 119-25
- VACCARINO, F.J., BLOOM, F.E. Y KOOB, G.F. (1985). Blockade of nucleus accumbens opiate receptors attenuates intravenous heroin reward in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 86(1-2): 37-42
- VALENSTEIN, E.S. Y CAMPBELL, J.F. (1966). Medial forebrain bundle-lateral hypothalamic area and reinforcing brain stimulation. *Am. J. Physiol.*, Feb; 210(2): 270-4.
- VALVERDE, O. Y ROQUES, B.P. (1998). Cholecystokinin modulates the aversive component of morphine withdrawal syndrome in rats. *Neurosci. Lett.*, Mar 6; 244(1): 37-40.
- VAN BOCKSTAELE, E.J., Y PICKEL, V.M. (1995). GABA-containing neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens in rat brain, *Brain Research*, 682 (1-2), 215-221.
- VAN BUSKIRK, R.L. Y SMITH, D.V. (1981). Taste sensitivity of hamster parabrachial pontine neurons. *Journal of neurophysiology*, Jan; 45(1); p. 144-71
- VAN DER KOOY, D., FIBIGER, H.C. Y PHILLIPS, A.G. (1978). An analysis of dorsal and median raphe self-stimulation: effects of parachlorophenylalanine. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 8(4): 441-5.
- VAN DER KOOY, D., SWERDLOW, N. Y KOOB, G.F. (1983). Paradoxical Reinforcing Properties of Apomorphine: Effects of Nucleus Accumbens and Area Postrema Lesions. *Brain Research*, 259, 111-118.
- VAN DER KOOY, D. Y KODA, L.Y. (1983). Organization of the projections of a circumventricular organ: the area postrema in the rat. *The Journal of comparative neurology*, Sep 20; 219(3); p. 328-38.
- VAN RIEZEN, H. Y LEONARD, B.E. (1990). Effects of psychotropic drugs on the behavior and neurochemistry of olfactory bulbectomized rats. *Pharmacology & therapeutics*, 47(1); p. 21-34
- VAN VORT, W. Y SMITH, G.P. (1983). The relationships between the positive reinforcing and satiating effects of a meal in the rat. *Physiol. Behav.*, Feb; 30(2): 279-84
- VAN WOLFSWINKEL, L., SEIFERT, W.F. Y VAN REE, J.M. (1985). Long-term changes in self-stimulation threshold by repeated morphine and naloxone treatment. *Life Sci.*, Jul 15; 37(2): 169-76.
- VEENING, J.G., COOLEN, L.M., SPOOREN, W.J., JOOSTEN, H., VAN OORSCHOT, R., MOS, J., RONKEN, E. Y OLIVIER, B. (1998). Patterns of c-fos expression induced by fluvoxamine are different after acute vs. chronic oral administration. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, Aug; 8(3); p. 213-26.
- VEENING, J.G., SWANSON, L.W., COWAN, W.M., NIEUWENHUYTS, R. Y GEERAEDTS, L.M. (1982). The medial forebrain bundle of the rat. II. An autoradiographic study of the topography of the major descending and ascending components. *J. Comp. Neurol.*, 20; 206 (1): 82-108.
- VEINANTE, P., STOECKEL, M.E., LASBENNES, F. Y FREUND-MERCIER, M.J. (2003). c-Fos and peptide immunoreactivities in the central extended amygdala of morphine-dependent rats after naloxone-precipitated withdrawal. *Eur. J. Neurosci.*, Sep; 18(5): 1295-305.
- VERBORGH, C. Y MEERT, T.F. (1999). Antagonistic effects of naloxone and naloxonazine on sufentanil-induced antinociception and respiratory depression in rats. *Pain*, Oct; 83(1): 17-24.
- VERTY, A.N., SINGH, M.E., MCGREGOR, I.S. Y MALLET, P.E. (2003). The cannabinoid receptor antagonist SR 141716 attenuates overfeeding induced by systemic or intracranial morphine. *Psychopharmacology (Berl)*, Jul; 168(3): 314-23
- VEZINA, P. Y STEWART, J. (1987). Morphine conditioned place preference and locomotion: the effect of confinement during training. *Psychopharmacology*, 93(2); p. 257-60
- VOREL, S.R., ASHBY, C.R. JR., PAUL, M., LIU, X., HAYES, R., HAGAN, J.J., MIDDLEMISS, D.N., STEMPEL, G. Y GARDNER, E.L. (2002). Dopamine D3 receptor antagonism inhibits cocaine-seeking and cocaine-enhanced brain reward in rats. *J. Neurosci.*, 1; 22(21): 9595-603.

- VRANG, N., PHIFER, C.B., CORKERN, M.M., BERTHOUD, H.R. (2003). Gastric distension induces c-Fos in medullary GLP-1/2-containing neurons. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 285: R470-R478
- WALKER, J.R., AHMED, S.H., GRACY, K.N. Y KOOB, G.F. (2000). Microinjections of an opiate receptor antagonist into the bed nucleus of the stria terminalis suppress heroin self-administration in dependent rats. *Brain Res.*, Jan 31; 854(1-2): 85-92.
- WALLACE, K.J. Y ROSEN, J.B. (2001). Neurotoxic lesions of the lateral nucleus of the amygdala decrease conditioned fear but not unconditioned fear of a predator odor: comparison with electrolytic lesions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, May 15; 21(10); p. 3619-27
- WANG, L., CARDIN, S., MARTINEZ, V., TACHE, Y. Y LLOYD, K.C. (1999). Duodenal loading with glucose induces fos expression in rat brain: selective blockade by devazepide. *Am. J. Physiol.*, Sep; 277(3 Pt 2): R667-74
- WANG, L., MARTINEZ, V., BARRACHINA, M.D.Y TACHE, Y. (1998). Fos expression in the brain induced by peripheral injection of CCK or leptin plus CCK in fasted lean mice. *Brain Res.*, Apr 27; 791(1-2): 157-66
- WANG, S., HAMBERGER, A., YANG, Q. Y HAGLID, K.G. (1994). Changes in neurofilament protein NF-L and NF-H immunoreactivity following kainic acid-induced seizures. *J. Neurochem.*, Feb; 62(2): 739-48.
- WARACZYNSKI, M. (2003). Lidocaine inactivation demonstrates a stronger role for central versus medial extended amygdala in medial forebrain bundle self-stimulation. *Brain Res.*, 7; 962 (1-2): 180-98.
- WARD, S.J., PORTOGHESE, P.S. Y TAKEMORI, A.E. (1982). Improved assays for the assessment of kappa- and delta-properties of opioid ligands. *Eur. J. Pharmacol.*, Nov 19; 85(2): 163-70.
- WATANABE, T., NAKAGAWA, T., YAMAMOTO, R., MAEDA, A., MINAMI, M. Y SATOH, M. (2002a). Involvement of glutamate receptors within the central nucleus of the amygdala in naloxone-precipitated morphine withdrawal-induced conditioned place aversion in rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, Apr; 88(4): 399-406.
- WATANABE, T., YAMAMOTO, R., MAEDA, A., NAKAGAWA, T., MINAMI, M. Y SATOH, M. (2002b). Effects of excitotoxic lesions of the central or basolateral nucleus of the amygdala on naloxone-precipitated withdrawal-induced conditioned place aversion in morphine-dependent rats. *Brain Res.*, Dec 27; 958(2): 423-8.
- WATANABE, T., NAKAGAWA, T., YAMAMOTO, R., MAEDA, A., MINAMI, M. Y SATOH, M. (2003). Involvement of noradrenergic system within the central nucleus of the amygdala in naloxone-precipitated morphine withdrawal-induced conditioned place aversion in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, Oct; 170(1): 80-8.
- WEI, E., LOH, H.H. Y WAY, E.L. (1973) Quantitative aspects of precipitated abstinence in morphine-dependent rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Feb; 184(2): 398-40.
- WEINER, N. Y MOLINOFF, P.B. (1994). Catecholamines. En: Siegel, G. J., Agranoff, B.W., Albers, R.W. & Molinoff, P.B., *Basic Neurochemistry (5<sup>th</sup> Ed.)*: Raven Press.
- WEISKRANTZ, L. (1960). Effects of medial temporal lesions on taste preference in the monkey. *Nature*, Sep 3; 187; p. 879-80
- WEISS, F., MALDONADO-VLAAR, C.S., PARSONS, L.H., KERR, T.M., SMITH, D.L. Y BEN-SHAHAR, O. (2000). Control of cocaine-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats: effects on recovery of extinguished operant-responding and extracellular dopamine levels in amygdala and nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Apr 11; 97(8): 4321-6
- WELCH, C.C., KIM, E.M., GRACE, M.K., BILLINGTON, C.J., LEVINE, A.S. (1996). Palatability-induced hyperphagia increases hypothalamic Dynorphin peptide and mRNA levels. *Brain Res.*, May 20; 721(1-2): 126-31
- WELDON, D.T., O'HARE, E., CLEARY, J., BILLINGTON, C.J. Y LEVINE, A.S. (1996). Effect of naloxone on intake of cornstarch, sucrose, and polycose diets in restricted and nonrestricted rats. *Am. J. Physiol.*, Jun; 270(6 Pt 2): R1183-8
- WHITE, N. M. Y MILNER, P. M. (1992). The Psychobiology of Reinforcers. *Ann. Rev. Psychol.*, 43, 443-471.
- WHITE, N.M. Y McDONALD, R.J. (1993). Acquisition of a spatial conditioned place preference is impaired by amygdala lesions and improved by fornix lesions. *Behav. Brain Res.*, 30; 55(2): 269-81.
- WHITE, N.M. Y McDONALD, R.J. (2002). Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.*, Mar; 77(2): 125-84.

- WHITE, P.F. (1989). Current and future trends in acute pain management. *The Clinical journal of pain*, 5 Suppl 1; p. S51-8
- WHITEHEAD, M.C. Y FRANK, M.E. (1983). Anatomy of the gustatory system in the hamster: central projections of the chorda tympani and the lingual nerve. *The Journal of comparative neurology*, Nov 10; 220(4); p. 378-95
- WHITELAW, R.B., MARKOU, A., ROBBINS, T.W. Y EVERITT, B.J. (1996). Excitotoxic lesions of the basolateral amygdala impair the acquisition of cocaine-seeking behaviour under a second-order schedule of reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)*, Oct; 127(3): 213-24.
- WIESENFELD-HALLIN, Z., DE ARAUJA LUCAS, G., ALSTER, P., XU, X.J. Y HOKFELT, T. (1999). Cholecystokinin/opioid interactions. *Brain Res.*, Nov 27; 848(1-2): 78-89
- WILCOXON, H.C., DRAGOIN, W.B. Y KRAL, P.A. (1971). Illness-induced aversions in rat and quail: relative salience of visual and gustatory cues. *Science (New York, N.Y.)*, Feb 26; 171(973); p. 826-8
- WILENSKY, A.E., SCHAFF, G.E. Y LE DOUX, J.E. (2000). The amygdala modulates memory consolidation of fear-motivated inhibitory avoidance learning but not classical fear conditioning. *J. Neurosci.*, Sep 15; 20(18): 7059-66.
- WILEY, J.L., BURSTON, J.J., LEGGETT, D.C., ALEKSEEVA, O.O., RAZDAN, R.K., MAHADEVAN, A. Y MARTIN, B.R. (2005). CB1 cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice. *Br. J. Pharmacol.*, Jun; 145(3): 293-300
- WILL, M.J., FRANZBLAU, E.B. Y KELLEY, A.E. (2003). Nucleus accumbens mu-opioids regulate intake of a high-fat diet via activation of a distributed brain network. *J. Neurosci.*, Apr 1; 23(7): 2882-8
- WILLIAMS, C.M. Y KIRKHAM, T.C. (1999). Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, Apr; 143(3): 315-7
- WILLIAMS, C.M. Y KIRKHAM, T.C. (2002). Observational analysis of feeding induced by Delta9-THC and anandamide. *Physiology & behavior*, Jun 1; 76(2); p. 241-50
- WILLIAMS, C.M., ROGERS, P.J. Y KIRKHAM, T.C. (1998). Hyperphagia in pre-fed rats following oral delta9-THC. *Physiol. Behav.*, Nov 15; 65(2): 343-6
- WILLIAMS, J.B., MURPHY, D.M., REYNOLDS, K.E., WELCH, S.J. Y KING, M.S. (1996). Demonstration of a bilateral projection from the rostral nucleus of the solitary tract to the medial parabrachial nucleus in rat. *Brain research*, Oct 21; 737(1-2); p. 231-7
- WILSON, J.D., NICKLOUS, D.M., ALOYO, V.J. Y SIMANSKY, .K.J. (2003). An orexigenic role for mu-opioid receptors in the lateral parabrachial nucleus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, Nov; 285(5): R1055-65.
- WIRTH, J.B. Y McHUGH, P.R. (1983). Gastric distension and short-term satiety in the rhesus monkey. *The American journal of physiology*, Aug; 245(2); p. R174-80
- WISE, R.A. (1982). Common Neural Basis for Brain Stimulation Reward, Drug Reward, and Food Reward. En: Hoebel, B. G. & Novin, D. (Eds.): *The Neural Basis of Feeding and Reward*, Haer Institute for Electrophysiol. Research., pp. 445-454.
- WISE, R.A. (1994). A Brief History of the Anhedonia Hypothesis. En: Legg, C. R. & Booth, D. A. (Eds.) *Appetite*, OUP, pp. 243-263.
- WISE, R.A. (1996). Addictive Drugs and Brain Stimulation Reward. *Annual Review of Neuroscience*, 19, 319-340.
- WISE, R.A. (1998): Drug-activation of Brain Reward Pathways. *Drug and Alcohol Dependence*, 51, 13-22.
- WISE, R.A. (2000). Addiction Becomes a Brain Disease. *Neuron*, 26, 27-33.
- WISE, R.A. (1987). The role of reward pathways in the development of drug dependence. *Pharmacol. Ther.*, 35(1-2): 227-63.
- WISE, R.A. (1989). Opiate reward: sites and substrates. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, Summer-Fall; 13(2-3): 129-33
- WISE, R.A. (2002). Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron*, Oct 10; 36(2): 229-40.
- WISE, R.A. Y BOZARTH, M.A. (1987). A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol. Rev.*, Oct; 94(4): 469-92
- WISE, R.A. Y DAWSON, V. (1974). Diazepam-induced eating and lever pressing for food in sated rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, May; 86(5): 930-41
- WISE, R.A. Y ROMPRÉ, P. P. (1989): Brain dopamine and reward. *Annual Review of Psychology*, 40, 191-225.

- WOLF, G. (1968). Projections of thalamic and cortical gustatory areas in the rat. *The Journal of comparative neurology*, Apr; 132(4); p. 519-30
- WOLF, S.S., BRASHEAR, H.R., LÉVESQUE, C.A. Y WOOTEN, G.F. (1992). Quantitative autoradiography of hemicholinium-3 binding sites in human amygdala. *Brain Res.*, Mar 6; 574(1-2): 349-52.
- WOLINSKY, T.D., CARR, K.D., HILLER, J.M. Y SIMON, E.J. (1996). Chronic food restriction alters mu and kappa opioid receptor binding in the parabrachial nucleus of the rat: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res.*, Jan 15; 706(2): 333-6
- WOODS, S.C. (1991). The eating paradox: how we tolerate food. *Psychological review*, Oct; 98(4); p. 488-505
- WOODS, S.C. (2004). Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*, Jan; 286(1); p. G7-13
- WOODS, S.C. (2009). The control of food intake: Behavioral versus Molecular Perspectives. *Cell Metabolism*, 9: 489-498
- WOODS, S.C., SCHWARTZ, M.W., BASKIN, D.G. Y SEELEY, R.J. (2000). Food intake and the regulation of body weight. *Annual review of psychology*, 51; p. 255
- YAKABI, K., IWABUCHI, H., NAKAMURA, T., ENDO, K., FUKUNAGA, Y., KUMAKI, I. Y TAKAYAMA, K. (2002). Neural expresión of Fos protein in the brain after intravenous injection of gastrin in rats. *Neurosci. Letters*, 317(2), 57-60.
- YAMAMOTO, T. (1984). Taste response of cortical neurons. *Progress in Neurobiol.*, 23, 273-315.
- Yamamoto, t. (1992). Central mechanisms of food aversion learning. *Neuroscience Research Supplements*, 17: 32.
- YAMAMOTO, T. (1993). Neural mechanisms of taste aversion learning. *Neurosci. Res.*, Mar; 16(3): 181-5
- YAMAMOTO, T. Y FUJIMOTO, Y. (1991). Brain mechanisms of taste aversion learning in the rat. *Brain Res. Bull.*, 27, 403-406.
- YAMAMOTO, T. Y SAWA, K. (2000a). c-Fos-like immunoreactivity in the brainstem following gastric loads of various chemical solutions in rats. *Brain Res.*, Jun 2; 866(1-2): 135-43
- YAMAMOTO, T. Y SAWA, K. (2000b). Comparison of c-fos-like immunoreactivity in the brainstem following intraoral and intragastric infusions of chemical solutions in rats. *Brain Res.*, Jun 2; 866(1-2): 144-51
- YAMAMOTO, T., FUJIMOTO, Y., SHIMURA, T. AND SAKAI, N. (1995). Conditioned taste aversion in rats with excitotoxic brain lesions. *Neurosci. Res.*, 22(1), 31-49.
- YAMAMOTO, T., MATSUO, R., FUJIMOTO, Y., FUKUNAGA, I., MIYASAKA, A. Y IMOTO, T. (1991). Electrophysiological and behavioral studies on the taste of umami substances in the rat. *Physiol. Behav.*, 49(5), 919-925.
- YAMAMOTO, T., MATSUO, R. Y KAWAMURA, Y. (1980). Localization of cortical gustatory area in rats and its role in taste discrimination. *J. Neurophysiol.*, 44(3), 440-55.
- YAMAMOTO, T., OHTORI, S. Y CHIBA, T. (2000a). Inhibitory effect of intrathecally administered nociceptin on the expression of Fos-like immunoreactivity in the rat formalin test. *Neurosci. Lett.*, Apr 28; 284(3): 155-8
- Yamamoto, T., Sako, N. Y Maeda, S. (2000b). Effects of taste stimulation on  $\beta$ -endorphin levels in rat cerebrospinal fluid and plasma. *Physiology & Behavior*, May 69(3): 345-350
- YAMAMOTO, T., SHIMURA, T., SAKAI, N. Y OZAKI, N. (1994b). Representation of hedonics and quality of taste stimuli in the parabrachial nucleus of the rat. *Physiology and Behavior*, Dec; 56(6): 1197-1202.
- YAMAMOTO, T., SHIMURA, T., SAKO, N., AZUMA, S., BAI, W. Y WAKISAKA, S. (1992). C-fos expression in the rat brain after i.p. injection of Lithium Chloride. *Neuroreport*, 3, 1049-1052.
- YAMAMOTO, T., SHIMURA, T., SAKO, N., SAKAI, N., TANIMIZU, T. Y WAKISAKA, S. (1993). C-fos expression in the parabrachial nucleus after ingestion of sodium chloride in the rat. *Neuroreport*, 4, 1223-1226.
- Yamamoto, T., Shimura, T., Sako, N. Y Tanimizu, T. (1992). Expression of c-Fos-like protein in the parabrachial nucleus following taste stimulation in the rat. *Neuroscience Research Supplements*, 17: 265.
- YAMAMOTO, T., SHIMURA, T., SAKO, N., YASOSHIMA, Y. Y SAKAI, N. (1994a). Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behavioral Brain Res.*, 65, 123-137.
- YAMAMOTO, T., SAKO, N., SAKAI, N. AND IWAFUNE, A. (1997). Gustatory and visceral inputs to the amygdala of the rat: conditioned taste aversion and induction of c-fos-like immunoreactivity. *Neurosci. Lett.*, 226(2), 127-30.



- YANG, H., WANG, L., WU, S.V., TAY, J., GOULET, M., BOISMENU, R., CZIMMER, J., WANG, Y, WU, S. Y TACHÉ, Y. (2004). Peripheral secretin-induced Fos expression in the rat brain is largely vagal dependent. *Neuroscience*, 128(1): 131-141.
- YASOSHIMA, Y., MORIMOTO, T. Y YAMAMOTO, T. (2000). Different disruptive effects on the acquisition and expression of conditioned taste aversion by blockades of amygdalar ionotropic and metabotropic glutamatergic receptor subtypes in rats. *Brain Res.*, 869(1-2): 15-24.
- YEOMANS, J.S. (1990). *Principles of Brain Stimulation*, OUP.
- YEOMANS, J.S. Y BAPTISTA, M. (1997). Both Nicotinic and Muscarinic Receptors in Ventral Tegmental Area Contribute to Brain-Stimulation Reward. *Pharmacol., Bio. & Beh.*, 57 (4), 915-921.
- YEOMANS, J.S., MATHUR, A. Y TAMPAKERAS, M. (1993). Rewarding Brain Stimulation: Role of Tegmental Cholinergic Neurons that Activate Dopamine Neurons. *Beh. Neurosci.*, 107 (6), 1077-1087.
- YEOMANS, M.R. (2000). Rating changes over the course of meals: what do they tell us about motivation to eat? *Neuroscience and biobehavioral reviews*, Mar; 24(2); p. 249-59
- YEOMANS, M.R. Y GRAY, R.W. (1997). Effects of naltrexone on food intake and changes in subjective appetite during eating: evidence for opioid involvement in the appetizer effect. *Physiology & behavior*, Jul; 62(1); p. 15-21
- YEOMANS, M.R. Y GRAY, R.W. (2002). Opioid peptides and the control of human ingestive behaviour. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, Oct; 26(6): 713-28
- YIRMIYA, R., LIEBLICH, I. Y LIEBESKIND, J.C. (1988). Reduced saccharin preference in CXBK (opioid receptor-deficient) mice. *Brain Res.*, Jan 12; 438(1-2): 339-42
- YOSHIDA, A., CHEN, K., MORITANI, M., YABUTA, N.H., NAGASE, Y., TAKEMURA, M. Y SHIGENAGA, Y. (1997). Organization of the descending projections from the parabrachial nucleus to the trigeminal sensory nuclear complex and spinal dorsal horn in the rat. *J. Comp. Neurol.*, Jun 23; 383(1): 94-111
- YU, W.Z., SCLAFANI, A., DELAMATER, A.R. Y BODNAR, R.J. (1999). Pharmacology of flavor preference conditioning in sham-feeding rats: effects of naltrexone. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Nov; 64(3): 573-84
- YUAN, C.S. Y BARBER, W.D. (1991). Parabrachial Nucleus; Neuronal evoked responses to gastric vagal and greater Splanchnic Nerve stimulation. *Brain Research Bulletin*, 27 (6), 797-803
- ZAFRA, M.A., MOLINA, F. Y PUERTO, A. (2003). Effects of perivagal administration of capsaicin on post-surgical food intake. *Auton. Neurosci.*, Aug 29; 107(1): 37-44
- ZAFRA, M.A., MOLINA, F. Y PUERTO, A. (2004). Effects of perivagal administration of capsaicin on food intake in animals after noxious gastric surgery. *Auton. Neurosci.*, Nov 30; 116(1-2): 84-8
- ZAFRA, M.A., PRADOS, M., MOLINA, F. Y PUERTO, A. (2006). Capsaicin-sensitive afferent vagal fibers are involved in concurrent taste aversion learning. *Neurobiology of learning and memory*, Nov; 86(3); p. 349-52
- ZAFRA, M.A., SIMÓN, M.J., MOLINA, F. Y PUERTO, A. (2002). The role of the external lateral parabrachial subnucleus in flavor preferences induced by predigested food administered intragastrically. *Brain Res.*, Sep 20; 950(1-2): 155-64
- ZAFRA, M.A., SIMÓN, M.J., MOLINA, F. Y PUERTO, A. (2005). Lesions of the lateral parabrachial area block the aversive component and induced-flavor preference for the delayed intragastric administration of nutrients in rats: effects on subsequent food and water intake. *Nutr. Neurosci.*, Oct-Dec; 8(5-6): 297-307
- ZARRINDAST, M.R., BAHREINI, T. Y ADL, M. (2002a). Effect of imipramine on the expression and acquisition of morphine-induced conditioned place preference in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 73(4): 941-9.
- ZARRINDAST, M.R., KARAMI, M., SEPEHRI, H. Y SAHRAEI, H. (2002b). Influence of nitric oxide on morphine-induced conditioned place preference in the rat central amygdala. *Eur. J. Pharmacol.*, 18; 453(1): 81-9.
- ZHANG, M. Y KELLEY, A.E. (1997). Opiate agonists microinjected into the nucleus accumbens enhance sucrose drinking in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, Aug; 132(4): 350-60
- ZHANG, M. Y KELLEY, A.E. (2000). Enhanced intake of high-fat food following striatal mu-opioid stimulation: microinjection mapping and fos expression. *Neuroscience*, 99(2): 267-77
- ZHANG, M. Y KELLEY, A.E. (2002). Intake of saccharin, salt, and ethanol solutions is increased by infusion of a mu opioid agonist into the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)*, Feb; 159(4): 415-23

- ZHEN, X., TORRES, C., CAI, G. Y FRIEDMAN, E. (2002). Inhibition of protein tyrosine/mitogen-activated protein kinase phosphatase activity is associated with D2 dopamine receptor supersensitivity in a rat model of Parkinson's disease. *Mol. Pharmacol.*, Dec; 62(6): 1356-63
- ZHENG, H., PATTERSON, L.M. Y BERTHOUD, H.R. (2002). CART in the dorsal vagal complex: sources of immunoreactivity and effects on Fos expression and food intake. *Brain Res.*, Dec 13; 957(2): 298-310
- ZHU, W. Y PAN, Z.Z. (2004). Synaptic properties and postsynaptic opioid effects in rat central amygdala neurons. *Neuroscience*, 127(4): 871-9.
- ZHU, W. Y PAN, Z.Z. (2005). Mu-opioid-mediated inhibition of glutamate synaptic transmission in rat central amygdala neurons. *Neuroscience*, 133(1): 97-103.
- ZITO, K.A., VICKERS, G. Y ROBERTS, D.C.S. (1985). Disruption of Cocaine and Heroine Self-Administration Following Kainic Acid Lesions of the Nucleus Accumbens. *Pharmacol. Bioch. & Beh.*, 23, 1029-1036.