



**Universidad de Granada  
Facultad de Psicología**

**Psicobiología  
Departamento de Psicología Experimental y Fisiología del  
Comportamiento**

**PREFERENCIAS COMPORTAMENTALES  
INDUCIDAS POR ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA  
INTRACEREBRAL: CARACTERÍSTICAS  
FUNCIONALES Y FARMACOLÓGICAS DEL EJE  
PARABRAQUIAL – INSULAR**

**TESIS DOCTORAL**

**RAQUEL GARCÍA PÉREZ**

**Granada, Junio de 2009**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Raquel García Pérez  
D.L.: GR 758-2012  
ISBN: 978-84-694-9326-7





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

CERTIFICA:

Que como Director de la Tesis Doctoral “Preferencias Comportamentales inducidas por Estimulación Eléctrica Intracerebral: Características Funcionales y Farmacológicas del Eje Parabraquial - Insular” realizada por la doctoranda Raquel García Pérez, en el Laboratorio de Psicobiología del Departamento de Psicología Experimental y Fisiología del Comportamiento 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 Junio de 2008.

Firmado: D. Amadeo Puerto Salgado.



**PREFERENCIAS COMPORTAMENTALES  
INDUCIDAS POR ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA  
INTRACEREBRAL: CARACTERÍSTICAS  
FUNCIONALES Y FARMACOLÓGICAS DEL EJE  
PARABRAQUIAL – INSULAR**

---

Raquel García Pérez

Psicobiología

Departamento de Psicología Experimental y Fisiología del Comportamiento

**TESIS DOCTORAL**

Director: D. Amadeo Puerto Salgado

Universidad de Granada

Junio 2009



*“Estar preparado es importante, saber esperar lo es aún más,  
pero aprovechar el momento adecuado es la clave de la vida”.*

*Arthur Schnitzler (1862-1931)*





# **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, de forma directa o indirecta, han participado en este trabajo:

En primer lugar, al Profesor Amadeo Puerto, director de esta Tesis, por ofrecerme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, así como por enseñarme la gran importancia que la autocrítica, la constancia y la meticulosidad desempeñan en la labor científica. Su entusiasmo, entrega y dedicación a la investigación constituyen un ejemplo a seguir.

A la Profesora Filomena Molina por su apoyo desinteresado y su gran implicación profesional y personal en el desarrollo de la investigación.

A las Profesoras y amigas M<sup>a</sup> José Simón y M<sup>a</sup> Ángeles Zafra, por tantas horas compartidas en el laboratorio y por su inestimable colaboración en este trabajo. También recordar aquí a Mariena Hurtado, amiga y compañera, por su participación en el último experimento de esta Tesis y en la realización de la histología, así como por su apoyo emocional y empuje, que han hecho que la última fase de esta investigación sea más llevadera.

A l@s profesor@s y amig@s Cristina Mediavilla, Antonio Bernal, Javier Mahía por su buena disposición y el interés mostrado en el desarrollo de esta Tesis.

A los demás compañer@s de laboratorio y profesor@s que de alguna forma se han interesado por este trabajo y han contribuido a mi formación.

Por último, hacer una especial mención a marido Antonio Liñán, por su ánimo y consejo en los momentos difíciles, y por no ver nada imposible. Y a mi familia, por apoyarme en todas las decisiones que he tomado y dedicarme gran parte de sus vidas.



*A Nono, por creer en mí.*



# ÍNDICE DE CAPÍTULOS

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>Resumen.</b> | I |
|-----------------|---|

## **INTRODUCCIÓN TEÓRICA**

|   |    |
|---|----|
| Introducción.   | 3  |
| 1. Los mecanismos de la recompensa cerebral.  | 6  |
| 1.1. Recompensa y Autoestimulación Eléctrica Intracerebral (AEIC).  | 6  |
| 1.1.1. Características de la Autoestimulación Eléctrica Intracerebral.  | 7  |
| 1.1.2. Consideraciones teóricas.  | 8  |
| 1.2. Anatomía y neuroquímica del sistema de recompensa cerebral.  | 12 |
| 1.2.1. La Autoestimulación Eléctrica Intracerebral como método de estudio del sustrato neuroanatómico y neuroquímico del sistema de recompensa cerebral.  | 13 |
| 1.2.2. El Condicionamiento de Preferencias por un Lugar (CPP) y la administración de sustancias de abuso como método de estudio de los mecanismos neuro-farmacológicos implicados en el sistema de recompensa cerebral. | 19 |
| Psicoestimulantes: Anfetaminas y cocaína.   | 25 |
| Opiáceos.   | 27 |
| 1.3. Otras estructuras cerebrales de carácter apetitivo.  | 33 |
| 2. Recompensa y aprendizaje apetitivo.  | 36 |
| 2.1. Aprendizaje gustativo: Preferencias y aversiones gustativas.   | 36 |

|   |    |
|---|----|
| 2.1.1. Aprendizaje de preferencias gustativas.                                      | 37 |
| 2.1.2. Aprendizaje interoceptivo o aversivo gustativo (AAG).                        | 46 |
| 2.1.2.1. Características del aprendizaje aversivo gustativo.                        | 47 |
| 2.1.2.2. Bases neuroanatómicas del aprendizaje aversivo gustativo.                  | 48 |
| 2.1.2.3. Aprendizaje gustativo secuencial o a largo plazo.                          | 56 |
| 2.1.2.4. Aprendizaje gustativo concurrente o a corto plazo.                         | 57 |
| 3. Anatomía y citoarquitectura del Complejo Parabraquial.                           | 59 |
| 3.1. Núcleo Parabraquial Medial (NPBm).   | 62 |
| 3.1.1. Aferencias del Núcleo Parabraquial Medial.                                   | 62 |
| 3.1.2. Eferencias del Núcleo Parabraquial Medial.                                   | 64 |
| 3.2. Núcleo Parabraquial Lateral (NPBl).  | 65 |
| 3.2.1. Aferencias del Núcleo Parabraquial Lateral.                                  | 66 |
| 3.2.2. Eferencias del Núcleo Parabraquial Lateral.                                  | 68 |
| 3.3. Sistemas de neurotransmisión localizados en el Complejo Parabraquial.          | 71 |
| 4. Anatomía y citoarquitectura de la Corteza Insular.                               | 74 |
| 4.1. Córtex Insular Anterior.   | 77 |
| 4.2. Córtex Insular Posterior.  | 77 |
| 4.3. Conexiones anatómicas de la Corteza Insular.                                   | 79 |
| 4.3.1. Aferencias de la Corteza Insular.  | 79 |
| 4.3.2. Eferencias de la Corteza Insular.  | 82 |
| 4.4. Sistemas de neurotransmisión localizados en la CI e implicaciones funcionales. | 86 |
| 5. Hipótesis de trabajo.  | 89 |

## **ESTUDIOS EXPERIMENTALES**

|   |    |
|---|----|
| CAPÍTULO I: PREFERENCIAS POR UN LUGAR INDUCIDAS POR LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DEL NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL EXTERNO: EFECTO DE LA NALOXONA. | 95 |
|---|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>EXPERIMENTO 1:</b> Preferencias por un lugar inducidas por la estimulación eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo: Efectos de la naloxona. | 97 |
|--|----|

|         |     |
|---------|-----|
| Método. | 100 |
|---------|-----|

|             |     |
|-------------|-----|
| Resultados. | 110 |
|-------------|-----|

|            |     |
|------------|-----|
| Discusión. | 114 |
|------------|-----|

|   |     |
|---|-----|
| CAPÍTULO II: PREFERENCIAS GUSTATIVAS INDUCIDAS POR ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DEL NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL EXTERNO EN TAREAS DE DISCRIMINACIÓN DEMORADAS Y EN CONTIGÜIDAD. | 119 |
|---|-----|

|  |     |
|--|-----|
| <b>EXPERIMENTO 2:</b> Preferencias gustativas inducidas por estimulación eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo en tareas de discriminación secuenciales demoradas. | 124 |
|--|-----|

|         |     |
|---------|-----|
| Método. | 124 |
|---------|-----|

|             |     |
|-------------|-----|
| Resultados. | 130 |
|-------------|-----|

|            |     |
|------------|-----|
| Discusión. | 133 |
|------------|-----|

|  |     |
|--|-----|
| <b>EXPERIMENTO 3:</b> Preferencias gustativas inducidas por estimulación eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo en tareas de discriminación en contigüidad. | 134 |
|--|-----|



|  |     |
|--|-----|
| Método.  | 134 |
| <b>EXPERIMENTO 3 A:</b> Aprendizaje de preferencias gustativas.  | 132 |
| Método.  | 136 |
| Resultados.  | 139 |
| Discusión.   | 141 |
| <b>EXPERIMENTO 3 B:</b> Aprendizaje de aversiones gustativas.  | 143 |
| Método.  | 143 |
| Resultados.  | 144 |
| Discusión.   | 146 |
| Discusión General del Capítulo II.   | 147 |
| <b>CAPÍTULO III: CONSISTENCIA EN LAS AVERSIONES O PREFERENCIAS POR UN LUGAR INDUCIDAS MEDIANTE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE LA CORTEZA INSULAR AGRANULAR POSTERIOR.</b>  | 153 |
| <b>EXPERIMENTO 4:</b> Consistencia en las aversiones o preferencias por un lugar inducidas mediante la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular Posterior. | 155 |
| Método.  | 157 |
| Resultados.  | 163 |
| Discusión.   | 164 |

|  |     |
|--|-----|
| CAPÍTULO IV: AVERSIONES Y PREFERENCIAS POR UN LUGAR INDUCIDAS MEDIANTE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE LA CORTEZA INSULAR AGRANULAR POSTERIOR: EFECTO DE LA NALOXONA. | 171 |
|--|-----|

|   |     |
|---|-----|
| <b>EXPERIMENTO 5:</b> Aversiones y preferencias por un lugar inducidas mediante la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular Posterior: Efecto de la Naloxona. | 173 |
|---|-----|

|         |     |
|---------|-----|
| Método. | 175 |
|---------|-----|

|             |     |
|-------------|-----|
| Resultados. | 178 |
|-------------|-----|

|            |     |
|------------|-----|
| Discusión. | 184 |
|------------|-----|

|  |     |
|--|-----|
| CAPÍTULO V: PERSISTENCIA REFORZANTE Y EFECTOS MOTORES DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA REPETIDA DE LA CORTEZA INSULAR AGRANULAR POSTERIOR Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE NALOXONA EN TAREAS DISCRIMINATIVAS NO DEMORADAS. | 189 |
|--|-----|

|  |     |
|--|-----|
| <b>EXPERIMENTO 6:</b> Persistencia reforzante y efectos motores de la estimulación eléctrica repetida de la Corteza Insular Agranular Posterior y de la administración de Naloxona en tareas discriminativas no demoradas. | 191 |
|--|-----|

|         |     |
|---------|-----|
| Método. | 194 |
|---------|-----|

|             |     |
|-------------|-----|
| Resultados. | 204 |
|-------------|-----|

|            |     |
|------------|-----|
| Discusión. | 209 |
|------------|-----|

|   |     |
|---|-----|
| CAPÍTULO VI: REDUCCIÓN EN LA EFICACIA REFORZANTE INDUCIDA POR LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA REPETIDA DE LA CORTEZA INSULAR AGRANULAR POSTERIOR. | 217 |
|---|-----|

|  |     |
|--|-----|
| <b>EXPERIMENTO 7: Reducción en la eficacia reforzante inducida por la estimulación eléctrica repetida de la Corteza Insular Agranular Posterior.</b> | 219 |
| Método.  | 221 |
| Resultados.  | 225 |
| Discusión.   | 228 |
| <br>   |     |
| <b>DISCUSIÓN FINAL.</b>  | 233 |
| <br>   |     |
| <b>CONCLUSIONES FINALES.</b>   | 269 |
| <br>   |     |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.</b>   | 273 |

## **RESUMEN**

El objetivo principal de la investigación descrita en esta Tesis Doctoral ha consistido en el análisis funcional y farmacológico de los efectos comportamentales inducidos por la estimulación eléctrica intracerebral del eje Parabraquial – Insular, en distintos modelos de aprendizaje. Los resultados obtenidos demuestran que la estimulación eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo (NPBle) induce comportamientos de preferencia en pruebas de condicionamiento por un lugar, aunque simultáneamente origina tres poblaciones de animales: “Positivos” (Reforzantes), “Negativos” (aversivos) y “Neutros” (indiferentes). Este refuerzo es bloqueado a través de la administración de antagonistas opiáceos, como la Naloxona, siempre que las pruebas se realicen en un contexto nuevo, pero no cuando se administra en el mismo laberinto en el que se desarrollaron las preferencias. El refuerzo o la aversión inducidas por la activación eléctrica del NPBle en tareas de discriminación gustativa, es dependiente de la utilización de pruebas en contigüidad inter-estimular, pero no cuando se lleva a cabo en tareas demoradas. Este aprendizaje adquirido no es retenido ni transferido a otras pruebas en las que se hayan introducido modificaciones estimulares (pruebas de inversión). La activación eléctrica del NPBle no parece sustentar conductas de autoestimulación eléctrica intracerebral.

En pruebas de condicionamiento por un lugar, la activación eléctrica de la Corteza Insular Agranular Posterior origina conductas consistentes en grupos diferentes de animales, que pueden ser de preferencia, aversión o evitación y neutra o indiferente. Esta activación de la Corteza Insular (CI) no evoca conductas de autoestimulación eléctrica intracerebral. El efecto reforzante puede ser bloqueado mediante la administración de Naloxona, siempre que se utilice un contexto nuevo, pero no si este antagonista opiáceo es administrado en el mismo laberinto donde se llevó a cabo el aprendizaje. La activación eléctrica de la CI genera preferencias gustativas en tareas de discriminación sin demora inter-estimular, un aprendizaje que los animales no logran transferir a situaciones estimulares nuevas (pruebas de inversión). Por otra parte, la estimulación repetida de esta región origina una reducción en el efecto reforzante de la activación cortical, que va acompañado de un incremento en la actividad locomotora vertical (respuesta de alzada/

”rearrings”) de los animales. En estas condiciones, la administración de naloxona a los animales expuestos a la estimulación repetida de la CI, provoca una evitación o aversión por el lugar del laberinto que previamente había sido preferido. Por último, la activación diaria de la CI Agranular Posterior provoca un descenso progresivo en el efecto reforzante de la estimulación, reducción que no se produce en el caso de la activación cortical en días alternos. Sin embargo, esta reducción en el efecto reforzante de la estimulación es reversible puesto que tras el incremento en la intensidad de la corriente eléctrica administrada, los animales vuelven a mostrar sus preferencias por el lugar estimulado.

# **INTRODUCCIÓN TEÓRICA**

---



## **INTRODUCCIÓN.**

Todos los organismos están dotados de los necesarios mecanismos de adaptación para asegurar su supervivencia y la de la especie. En el medio natural resulta habitual que los individuos deban tomar decisiones que requieran la integración entre los cambios provocados en su medio interno (restablecimiento y mantenimiento de la homeostasis) y los de su entorno. En este contexto la capacidad de aprendizaje a partir de la experiencia previa resulta crucial para la supervivencia, es decir, se trataría de repetir aquellos comportamientos que tienen consecuencias positivas y entre ellos los relacionados con la búsqueda de alimento, agua o pareja, por ejemplo, y eliminar, por el contrario, aquellas conductas que puedan resultar, a saber la exposición a depredadores, a los extremos de frío o calor, etc. (Elliot et al., 2000; Kelley, 2004).

Así algunos teóricos del aprendizaje como Thorndike o Skinner, han propuesto que la adquisición de un determinado comportamiento es dependiente de sus consecuencias, es decir, toda conducta recompensada es preferentemente aprendida e incluida en el repertorio conductual del organismo. En esta línea, aquellos estímulos o eventos que potencian la aparición de estas respuestas, con las cuales son contingentes, son considerados reforzantes o reforzadores mientras que los que dificultan esa conducta son considerados aversivos (White y Milner, 1992; Schultz, 1997). Desde este punto de vista, las propiedades motivacionales de un estímulo (E) (refuerzo o aversión) describen el impacto que dicho estímulo ejerce sobre la conducta, generando respuestas de aproximación (en el caso de los estímulos reforzantes) o evitación (estímulos aversivos) ante determinadas situaciones (Nader et al., 1997). Por otra parte, atendiendo al efecto reforzante del estímulo, se podrían diferenciar entre dos tipos de reforzadores: Reforzadores Primarios, que serían aquellos que están relacionados con las necesidades básicas del organismo, y Reforzadores Secundarios que podrían definirse como aquellos estímulos inicialmente neutros que adquieren propiedades reforzantes por su asociación repetida con un reforzador primario (White y Milner, 1992; Schultz, 1997; Robbins y Everitt, 1999).



Esta aproximación teórica, además de excluir totalmente cualquier connotación motivacional en la definición de reforzador positivo, no explica cuales son las variables intervinientes en el cambio conductual. Este hecho fomentó la aparición de nuevos enfoques que postulaban que un estímulo es un reforzador positivo si evoca placer o afecto positivo en el organismo, y además se produce un aprendizaje por relación entre los estímulos y sus consecuencias, y no solo por una relación contingente entre ambos. En este sentido, se considera que el valor reforzante asociado a un estímulo no es una propiedad intrínseca y estática del estímulo, sino que puede variar en función de las necesidades internas del organismo, bien sea en ese momento o dependiendo de la experiencia previa con dicho estímulo (Schultz et al., 1997). Así, un mismo alimento puede resultar un estímulo neutro para un individuo con sus necesidades energéticas cubiertas, mientras que en el caso de que exista un déficit en las reservas de energía (con la consiguiente sensación de hambre), este hecho motivará la búsqueda e ingesta del alimento que ahora actuará como un reforzador positivo. Por el contrario, cuando el consumo de un alimento va asociado, por ejemplo, a malestar gastrointestinal, se suele desarrollar un estado de aversión que en el futuro provocará la evitación de dicho alimento, y que, de este modo, actuará como un reforzador negativo (Toates, 2001). Siguiendo estos planteamientos, el concepto de refuerzo fue entendido inicialmente en términos de reducción de “drive” o impulso, considerando como reforzador todo estímulo que reduce un estado de necesidad o desequilibrio del organismo (Toates, 1989; Molina y Puerto, 1990; White y Milner, 1992) e incluyendo que éste dará lugar a un fortalecimiento de los hábitos Estímulo-Respuesta precedentes o un aumento de la probabilidad de ocurrencia de la respuesta operante asociada.

Existen situaciones en las que la mera presencia del reforzador o la activación de su representación neural puede desencadenar las respuestas propias de un estímulo reforzante. Así, la presencia de una comida apetitosa puede facilitar el inicio y el mantenimiento de su ingesta a pesar de tener las necesidades nutricionales cubiertas (Le Magnen et al., 1980; Le Magnen, 1992). Esto ha conducido a nuevas propuestas sobre el concepto de recompensa más allá de un simple reforzador de hábitos, introduciendo conceptos teóricos como el de incentivo hedónico que ahora incorpora representaciones mentales del mundo externo que eliciten motivación y planes de acción dirigidos hacia la consecución de una determinada meta (Bindra, 1974; Molina y Puerto, 1990; White y Milner, 1992; Kelley y Berridge, 2002). En este sentido, algunos autores, consideran que los reforzadores actuarían especificando la meta hacia la que se dirige la conducta, mientras que los sistemas

motivacionales sería los intermediarios entre los sistemas sensoriales que perciben los estímulos y los sistemas efectores encargados de la ejecución de la respuesta (Rolls, 2000).

En cuanto a las reacciones conductuales que inducen los reforzadores, se han observado dos tipos de respuestas: inicialmente una conducta preparatoria de aproximación o búsqueda del estímulo, que se caracteriza por una alta flexibilidad (por ejemplo atravesar un laberinto para conseguir comida), y posteriormente la conducta consumatoria, que es refleja y estereotipada, y se lleva a cabo en presencia de un reforzador concreto (por ejemplo, la ingesta de un determinado alimento) (Toates, 1989; Nader et al., 1997; Schultz, 1997; Robbins y Everitt, 1996; 1999).

Mediante este enfoque se considera que el efecto que un estímulo reforzador ejerce sobre de la motivación puede medirse mediante distintas pruebas objetivas como respuestas consumatorias, presión de pedal, preferencia espacial, preferencia gustativa... (Liebman, 1989). Uno de los primeros descubrimientos neurobiológicos en este sentido fue el fenómeno de autoestimulación eléctrica intracerebral (Olds y Milner, 1954).

## **1. LOS MECANISMOS DE LA RECOMPENSA CEREBRAL.**

### **1.1. RECOMPENSA Y AUTOESTIMULACIÓN ELÉCTRICA INTRACEREBRAL.**

El fenómeno de Autoestimulación Eléctrica Intracerebral fue descrito por primera vez por Olds y Milner (1954). Esta conducta fue observada inicialmente en roedores, aunque posteriores investigaciones han puesto de manifiesto la presencia de dicho fenómeno en una amplia variedad de especies, desde los peces hasta el hombre (Phillips y Fibiger, 1989).

Una de las primeras observaciones que describieron Olds y Milner fue que los animales empleados en su estudio volvían al lugar donde habían recibido estimulación eléctrica. Posteriormente pudieron comprobar que los animales, podían llevar a cabo una respuesta instrumental (presionar una palanca) que les permitiera auto-administrarse pulsos eléctricos en determinadas zonas del cerebro, de ahí que el fenómeno fue conocido como “Autoestimulación Eléctrica Intracerebral” (ver Figura 1). Este descubrimiento implicaba la existencia de un sistema neural especializado, cuya activación producía unos efectos



comportamentales comparables a los observados con otros reforzadores naturales como puede ser la conducta de animales privados ante la presencia de alimento (Yeomans, 1990; Wise, 2005).

**Figura 1.** Fotografía de una rata Wistar presionando la palanca de una caja de autoestimulación eléctrica intracerebral (AEIC).

A partir de este descubrimiento, uno de los principales objetivos de las investigaciones posteriores ha consistido en intentar determinar el significado así como la neuroquímica y los circuitos neuroanatómicos implicados en la conducta de autoestimulación, ya que se suponía que estos sistemas también podrían mediar el efecto reforzante inducido por estímulos naturales como la comida, el sexo, el agua o incluso de otros reforzadores artificiales, como las drogas de abuso (Wise y Rompre, 1989; Wise, 1996; Nader et al., 1997; Wise, 2002; Kelley y Berridge, 2002; Kelley, 2004).

### **1.1.1. CARACTERÍSTICAS DE LA AUTOESTIMULACIÓN ELÉCTRICA INTRACEREBRAL.**

La Autoestimulación Eléctrica Intracerebral constituye un modelo comportamental que posee una serie de características propias. Destaca entre ellas, la *rapidez* del proceso de *adquisición* de la conducta y el *alto índice de la conducta instrumental* que los sujetos pueden desarrollar para conseguir la estimulación, llegando a presionar la palanca/ pedal durante largos periodos de tiempo hasta terminar exhaustos, e ignorando otras actividades motivacionales. Además, este proceso se lleva a cabo habitualmente, *sin necesidad de privación*. Esto sugiere que la estimulación directa de determinadas zonas cerebrales *es poderosamente reforzante*, así como que *no* se ve afectada por la *saciedad* (Deutsch y Deutsch, 1973; Bozarth, 1994).

No obstante, la AEIC no parece ser un fenómeno unitario, con unas características fijas independientes de la zona estimulada, sino que el patrón de adquisición, la tasa de la respuesta operante así como las conductas asociadas no son iguales en todas las áreas estimuladas. Cada zona posee unas características, por ejemplo la estimulación eléctrica del Área Septal o del Hipotálamo Lateral, se caracteriza por el mismo patrón de adquisición y de respuesta descrito anteriormente (Olds y Milner, 1954), mientras que la estimulación de otras áreas cerebrales requiere horas de entrenamiento para finalmente conseguir una tasa de respuesta de alrededor de 10 presiones de la palanca por minuto (similar a lo observado cuando se emplean reforzadores naturales en lugar de estimulación intracerebral) (Trowill et al., 1969).

Por otra parte, se observa una gran labilidad en esta conducta, ya que se produce una *rápida extinción* de la respuesta cuando la estimulación deja de ser administrada durante un

breve periodo de tiempo. Es decir, no se observa el patrón conductual típico de la extinción de los reforzadores naturales, caracterizado por un aumento inicial en la respuesta para después producirse un descenso progresivo en la ejecución de la conducta.

Asimismo, en AEIC *no* se produce una *recuperación espontánea de la conducta* cuando el animal con experiencia previa, es introducido de nuevo en la jaula de autoestimulación para un nuevo ensayo. Dicha respuesta solo se recupera si el investigador *incita la respuesta* y le proporciona algunas estimulaciones antes de cualquier respuesta, en cuyo caso el animal comienza a autoestimularse inmediatamente a un ritmo elevado. Por todo ello, el empleo de programas de refuerzo intermitente o el uso de intervalos muy largos entre ensayos, deteriora la ejecución de la conducta (Deutsch y Deutsch, 1973).

Esta última característica ha originado un amplio debate y muchos investigadores han sugerido que la AEIC no sólo favorece el aprendizaje fortaleciendo o reforzando las conexiones entre un estímulo y sus consecuencias sino que también proporciona la motivación o el impulso para emitir la conducta de nuevo, lo cual contribuye a que los expertos en Autoestimulación Intracerebral prefieran hablar en términos de recompensa en lugar de utilizar el concepto de refuerzo (Deutsch y Deutsch, 1973; Wise, 1989).

### **1.1.2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS.**

De acuerdo con las peculiaridades de la AEIC, se han generado distintas interpretaciones teóricas. Entre ellas, Trowill y Panksepp (1969) sugieren que las características de la AEIC son semejantes a las de otros reforzadores (como los reforzadores naturales), siempre y cuando las condiciones para su estudio en ambos casos sean semejantes. Así, al igual que los animales saciados son capaces de actuar o emitir una conducta entrenada para conseguir una recompensa natural muy apetitosa (como puede ser leche con chocolate), en la autoestimulación los animales mantienen la conducta no porque estén en un estado de déficit sino porque el valor incentivo del refuerzo es muy alto (Teoría de Incentivo) (Trowill et al., 1969).

La teoría homeostática de Deutsch propone por su parte, la existencia de dos sustratos neurobiológicos diferentes, uno implicado en el proceso de refuerzo o recompensa y otro con el estado de déficit o “drive”/ impulso, considerando que el fenómeno de

autoestimulación es debido a la activación simultánea de ambos. Es decir, mediante la estimulación eléctrica intracerebral se estaría provocando un continuo estado de déficit y recompensa, lo que hace que se mantenga la conducta de autoestimulación de forma repetida y vigorosa (Deutsch, 1964; Deutsch y Deutsch, 1973; Hawkins et al., 1983; Yeomans, 1990).

Otras interpretaciones sugieren que la AEIC reflejaría un comportamiento de evitación activa en el cual el sujeto se autoestimula para evitar el estado negativo que tiene lugar cuando ha cesado el estímulo anterior (Teoría hedonista-adictiva de Ball).

Finalmente, la teoría hedonista de Olds, sugiere que existen dos sistemas neurales, uno encargado de evocar sensaciones placenteras y otro aversivas (Deutsch y Deutsch, 1973). Con respecto al sistema aversivo, fueron J.M. Rodríguez Delgado y asociados los primeros en demostrar que la estimulación eléctrica de determinadas regiones cerebrales podía producir efectos aversivos con sus correspondientes respuestas de escape o defensivas (Delgado et al., 1954; Anderson et al., 1995; Brandão et al., 1999; Diotte et al., 2000; Rada y Hoebel, 2001). De hecho, la estimulación eléctrica del Hipotálamo, por ejemplo, puede tener efectos reforzantes o aversivos según la localización anatómica del electrodo, de manera que el efecto reforzante que sustenta las conductas de autoestimulación se localiza en posiciones laterales, mientras que los signos de aversión y el incremento en las respuestas de escape se produce tras la estimulación de las zonas mediales (Hoebel, 1976; Brandão et al., 1999). También se han identificado estructuras relacionadas con el procesamiento emocional aversivo o con las respuestas del organismo ante estímulos dolorosos o amenazantes en otras áreas cerebrales como por ejemplo, la Amígdala (Bures et al., 1998; Wall y Melzack, 1998).

Actualmente las pruebas disponibles han demostrado la existencia de coincidencias anatómicas en distintos núcleos cerebrales relacionados con el procesamiento de la información aversiva y reforzante (Hoebel, 1976; Diotte et al., 2000) así como zonas cuya estimulación provoca efectos ambivalentes (Anderson et al., 1995; Diotte et al., 2000). Estos resultados junto con otras investigaciones parecen sugerir la existencia de interacciones entre los sistemas reforzantes y aversivos (Hoebel, 1976; Salamone, 1994; Brandão et al., 1999; Robbins y Everitt, 1999; O'Doherty et al., 2001).

Es probable que la AEIC pueda consistir en la activación del sistema de recompensa endógeno que subyace a los reforzadores naturales como la comida, el agua, sexo (Wise y Rompre, 1989; Wise, 1996) e incluso, como indican las más recientes investigaciones, al sustrato que subyace a la acción de algunas drogas de abuso (Wise, 1996, 2002; Kelley y Berridge, 2002).

Numerosas investigaciones apoyan este último planteamiento. En primer lugar, la estimulación cerebral a través de los mismos electrodos que median la autoestimulación, origina conductas motivadas naturales como comer, beber, conductas maternas o cópula (Carr, 1996; Toates, 2001). Asimismo, si se provoca un aumento en la motivación natural, por ejemplo, mediante la privación de agua o de comida, se produce un aumento en el ritmo de autoestimulación (Hoebel, 1976; Berman et al., 1994; Carr y Papadouka, 1994; Wolinsky et al., 1994; 1996; Abrahamsen et al., 1995; Bodnar et al., 1995; Carr, 1996; Leventhal y Bodnar, 1996; Ragnauth et al., 1997; Carr et al., 1998; Carr et al., 1999; Carr y Kutchukhidze, 2000).

Por su parte, la presentación de reforzadores naturales (como una comida apetitosa), la ingesta o la administración intragástrica de nutrientes influye en la actividad fisiológica de la vía neuronal implicada en el refuerzo inducido por AEIC ya que se observa un descenso en el umbral de autoestimulación (Bradshaw y Szabadi, 1989; Carr, 1996). Estos umbrales también pueden verse afectados por los estados de privación o saciedad (Hoebel, 1976; Rolls, 1973; Rolls et al., 1976; Rolls et al, 1979). Concretamente Rolls y colaboradores descubrieron que, la actividad celular de algunas regiones cerebrales, como el Córtex Prefrontal o el Hipotálamo Lateral, se activaban ante la presencia de nutrientes sólo si el animal estaba privado de alimento, pero no en condiciones de saciedad (Rolls, 1973; Rolls et al., 1976; Rolls et al, 1979; Rolls, 1997), y que estas mismas regiones cerebrales pueden sustentar la conducta de AEIC (Rolls, 1999).

Finalmente, diversos estudios han demostrado la existencia de coincidencias entre los circuitos anatómicos relacionados con los reforzadores naturales y muchas de las estructuras implicadas el refuerzo eléctrico intracerebral (Olds y Forbes, 1981; Wise y Rompré, 1989; Rolls, 1982; 1994; Robbins y Everitt, 1999). De hecho, algunas investigaciones que han empleado técnicas lesivas demuestran que la alteración en el funcionamiento de las vías implicadas en la AEIC suelen provocar también alteraciones que repercuten sobre la conducta de los reforzadores naturales (Bradshaw y Szabadi, 1989).

Por otra parte, un buen número de estudios farmacológicos han demostrado que sustancias con un alto potencial adictivo como las anfetaminas, la cocaína o los opiáceos, entre otras, podrían estar implicadas en la AEIC (Jenk et al., 1987; Carlezon y Wise, 1993) ya que, al igual que en la nutrición, provocan un incremento en la liberación de dopamina en el núcleo Accumbens (Toates, 2001; White, 2002). Todas ellas además actuarían facilitando la AEIC, en contraposición a los efectos inhibidores provocados por la administración de antagonistas dopaminérgicos (Gallistel y Karras, 1984).

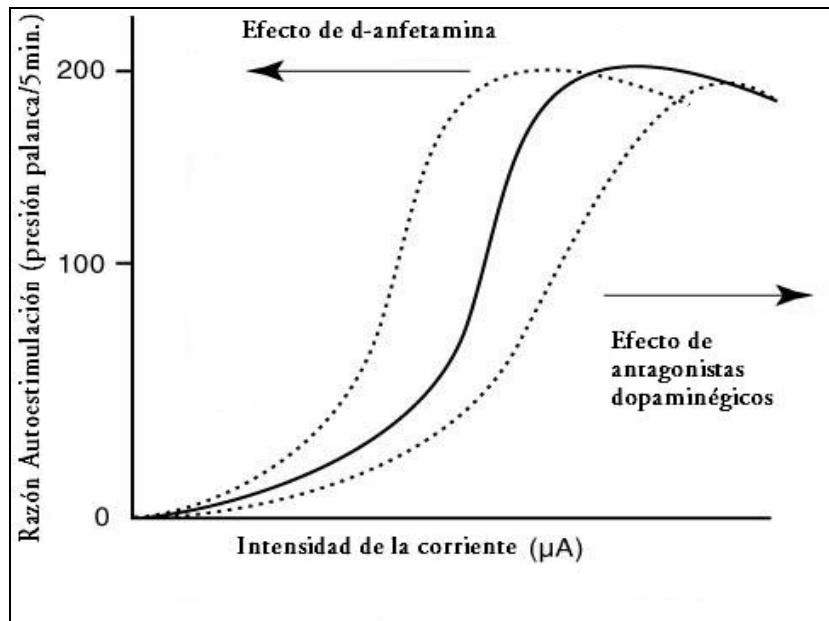
Generalmente para la inducción de Autoestimulación Eléctrica Intracerebral, se emplean pulsos rectangulares de corriente negativa con una duración de 0.1 milisegundos y una frecuencia que oscila entre 20 y 200 ciclos/segundo (hercios, Hz.). La intensidad se ha relacionado con el tamaño del campo estimulado y la duración de los trenes de estimulación con el vigor del comportamiento; aunque estos parámetros pueden ser modificados (Yeomans, 1990; Wise, 1996).

Una de las formas comportamentales empleadas para estimar la potencia o eficacia de la estimulación para inducir refuerzo, ha consistido en el análisis de los cambios producidos en la tasa de respuesta, modificando para ello uno de los parámetros relacionados con la corriente empleada, como puede ser la duración del pulso o del tren de pulsos, la intensidad o la frecuencia, manteniendo el resto de los parámetros constantes (Gallistel y Karras, 1984; Miliareisis et al., 1986; Stellar y Rice, 1989; Wise, 1996b). El resultado obtenido consiste en una curva de respuesta-frecuencia, respuesta-intensidad o respuesta-duración con forma de "S", en la que se observa que dosis bajas de estimulación no sustentan conductas de AEIC, y a medida que aumentan los parámetros de estimulación se observa un incremento progresivo en la tasa de respuesta hasta que por último, que se produce un valor máximo asintótico en los niveles de estimulación, por encima del cual la tasa de respuesta se mantiene constante (Wise, 1996b).

Estas funciones tasa respuesta-frecuencia; respuesta-intensidad o respuesta-duración han resultado muy útiles ya que a través de ellas se puede detectar los efectos que provocan los cambios en la potencia o eficacia de la estimulación y cómo distintas sustancias afectan a la eficacia o potencia reforzante de la estimulación. Estos efectos se observan concretamente a través de un desplazamiento lateral de la curva de respuesta (hacia la izquierda o derecha); constituyendo así una medida selectiva del refuerzo inducido por la estimulación (ver Figura 2) (Miliareisis et al., 1986; Wise, 1996b). Así, por ejemplo,



investigaciones recientes han demostrado que el uso de sustancias de abuso como la morfina, cocaína o las anfetaminas, desplaza hacia la izquierda la función tasa de respuesta-intensidad (Jenck et al., 1987; Carlezon y Wise, 1993). Por su parte, los cambios observados en la dimensión vertical de esta curva proporcionan información sobre los cambios en la capacidad o posibilidades motoras del sujeto para llevar a cabo la tarea (Miliaressis et al., 1986; Stellar y Rice, 1989; Wise, 1996b).



**Figura 2.** Representación gráfica de la función tasa de respuesta-intensidad de la conducta de Autoestimulación Eléctrica Intracerebral. Efectos facilitadores (desplazamiento de la función hacia la izquierda) de la administración de agentes farmacológicos como la d-anfetamina o la cocaína; y efectos inhibidores (desplazamiento de la función hacia la derecha) de la administración de fármacos antagonistas dopaminérgicos como el pimocida o la clorpromacina. Adaptado de Robbins y Everitt, 2002).

## 1.2. ANATOMÍA Y NEUROQUÍMICA DEL SISTEMA DE RECOMPENSA CEREBRAL.

La delimitación del sustrato neuroanatómico del sistema de recompensa cerebral ha sido llevada a cabo mediante el uso de la Autoestimulación Eléctrica Intracerebral y modelos conductuales como el Condicionamiento de Preferencias Espaciales o la

Autoadministración de sustancias, así como a la combinación de diversos procedimientos con técnicas funcionales (por ejemplo, resonancia magnética funcional, tomografía por emisión de positrones...) en animales y en seres humanos.

### **1.2.1. LA AUTOESTIMULACIÓN ELÉCTRICA INTRACEREBRAL (AEIC) COMO MÉTODO DE ESTUDIO DEL SUSTRATO NEUROANATÓMICO Y NEUROQUÍMICO DEL SISTEMA DE RECOMPENSA CEREBRAL.**

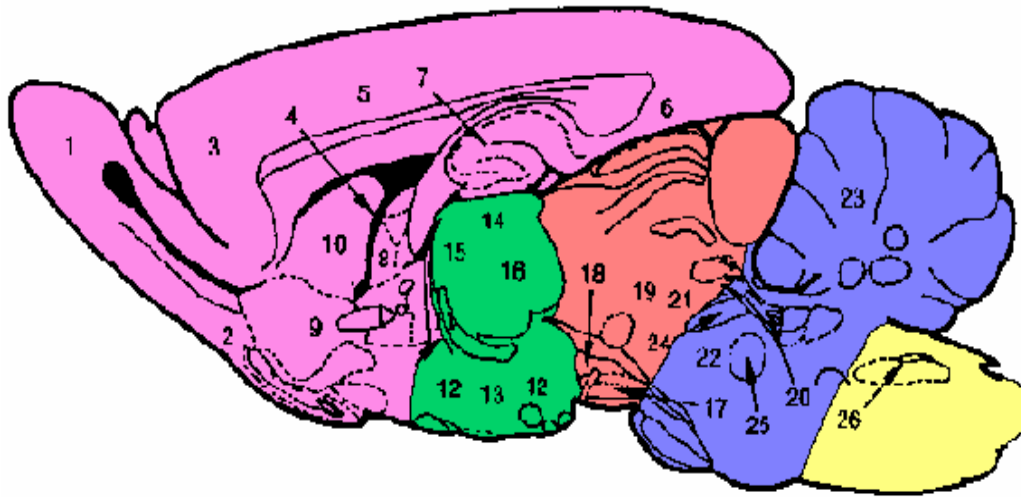
Como ya se ha mencionado más arriba, las características reforzantes de la AEIC permiten suponer que las áreas implicadas en autoestimulación podrían ser las mismas que las implicadas en los procesos de recompensa obtenida con reforzadores naturales como el agua o la comida (Wise y Rompre, 1989; Wise, 1996b). Partiendo de esta premisa se ha pretendido elaborar un mapa de los circuitos cerebrales implicados en el “placer” o recompensa. El mayor volumen de resultados lo han aportado los estudios de *mapeado cerebral*. Como puede observarse en la Figura 3, se ha logrado identificar un buen número de regiones cerebrales que van desde el Tronco Cerebral hasta el Prosencéfalo Basal (Routtenberg, 1976; Olds y Forbes, 1981; Phillips y Fibiger, 1989; Wise y Rompre, 1989; Gallistel et al., 1996; Robbins y Everitt, 1999; Arvanitogiannis et al., 2000; Nakahara et al., 2001).

Pero es en el Diencefalo, donde se han obtenido las tasas de respuesta de autoestimulación mas vigoras con los umbrales de estimulación mas bajos, sobre todo, al estimular las áreas cerebrales que se distribuyen principalmente a lo largo del Fascículo Prosencefálico Medial (FPM), haz de fibras ascendentes y descendentes que se extienden desde estructuras rostrales como el Área Preóptica o la Banda de Broca hasta el Área Tegmental Ventral (ATV). (Routtenberg, 1976; Wise y Rompre, 1989; Gallistel et al., 1996; Wise, 1998). Se han realizado distintas investigaciones para determinar la dirección ascendente y descendente del flujo de la transmisión de la información en el FPM. En este sentido, algunas líneas de trabajo aportan pruebas de que los impulsos generados en esta vía del FPM, pueden seguir inicialmente una ruta descendente: A) Así, mediante el uso de *técnicas lesivas*, se ha podido demostrar que las lesiones del FPM provocan un mayor deterioro conductual si se realizan en las zonas posteriores a la localización del electrodo, que si dichas lesiones se localizan anteriormente a éste (Stellar y Neeley, 1982).

B) igualmente, se han identificado el tipo de vías y las neuronas que son activadas por la estimulación eléctrica intracerebral del FPM (Wise y Rompre, 1989; Wise, 1998): Son fibras de gran calibre, mielinizadas y que proyectan en dirección descendente desde estructuras más rostrales como el Hipotálamo Lateral, el Área Preóptica, la Banda de Broca y el Núcleo Caudado hacia el Área Tegmental Ventral (Gallistel, 1976; Yeomans, 1982; Wise y Rompré, 1989; Konkle et al., 1999). Al parecer, existen al menos dos subpoblaciones de neuronas implicadas en este efecto recompensate: Una con periodos refractarios breves, con una velocidad de conducción de estímulos nerviosos rápida; y otra subpoblación neuronal de menor tamaño, más lenta y con periodos refractarios más largos que podría ser colinérgica (Bielajew y Shizgal, 1986; Wise y Rompre, 1989; Yeomans, 1990).

Estas investigaciones además, han permitido establecer conexiones entre distintos lugares de recompensa distribuidos a lo largo del Haz Prosencefálico Medial, empleando para ello *técnicas de colisión de pulsos* (Bielajew y Shizgal, 1986; Shizgal, 1989; Shizgal y Murray, 1989). Estos estudios ofrecen pruebas de que las neuronas con axones largos y orientados sagitalmente, constituyen parte del sustrato que es estimulado directamente por la estimulación eléctrica del FPM y la Sustancia Gris Periacueductal (PAG) (Shizgal y Murray, 1989). Asimismo, indican que las fibras recompensantes del FPM conectan el Área Preóptica Lateral (APL) con Áreas del Hipotálamo Lateral y con la PAG (Shizgal, 1989; Shizgal y Murray, 1989), y el Hipotálamo Lateral con el ATV (Bielajew y Shizgal, 1986). Otros autores han mostrado datos de la existencia de fibras recompensantes comunes que conectan el Hipotálamo Posterior y el ATV con estructuras más caudales como el sistema medial pontino (Wise y Rompre, 1989), lo que demuestra que no todas las fibras del FPM finalizan en el ATV (Shizgal y Murray, 1989).

Por otra parte, el análisis de los *sistemas neuroquímicos* que participan en los procesos de AEIC han permitido demostrar, mediante el uso de neurotoxinas y posteriormente mediante técnicas de histología fluorescente, que la destrucción de las terminales catecolaminérgicas provoca un deterioro moderado en la tasa de AEIC, aunque la distribución anatómica de las vías catecolaminérgicas se superpone en gran medida con las regiones cerebrales que sustentan conductas de autoestimulación (Wise y Rompre, 1989; Baucó y Wise, 1994; Wise, 1996b; Salamone et al., 1997; Sokolowski et al., 1998).



| Telencéfalo              | Diencéfalo              | Mesencéfalo          | Metencéfalo         |
|--------------------------|-------------------------|----------------------|---------------------|
| 1. Bulbo olfatorio.      | 11. Fómix.              | 17. Sustancia negra. | 23. Cerebelo.       |
| 2. Corteza prepiriforme. | 12. Hipotálamo lateral. | 18. Área tegmental   | 24. Pedículo sup.   |
| 3. Corteza prefrontal    | 13. Hipotálamo          | ventral.             | del cerebelo.       |
| 4. Órgano subformical    | 14. N. dorsomedial del  | 19. Sustancia gris   | 25. N. motor del    |
| 5. Corteza cingulada.    | Tálamo.                 | periacueductal.      | Nervio trigémino.   |
| 6. Corteza entorrinal.   | 15. N. paratenial del   | 20. N. mesencefálico |                     |
| 7. Hipocampo.            | Tálamo.                 | del nervio trigémino |                     |
| 8. Septum.               | 16. N. central del      | 21. Rafe dorsal.     |                     |
| 9. N. Accumbens.         | Tálamo.                 | 22. Rafe medial.     |                     |
| 10. Cuerpo estriado.     |                         |                      |                     |
| No mostrados:            |                         |                      |                     |
| Globo pálido.            |                         |                      |                     |
| Amígdala.                |                         |                      |                     |
| Habénula.                |                         |                      |                     |
|                          |                         |                      | <b>Mielencéfalo</b> |
|                          |                         |                      | 26. N. del tracto   |
|                          |                         |                      | Solitario.          |

**Figura 3.** Principales puntos de autoestimulación eléctrica intracerebral en el encéfalo de la rata (Adaptado de Phillips y Fibiger, 1989).

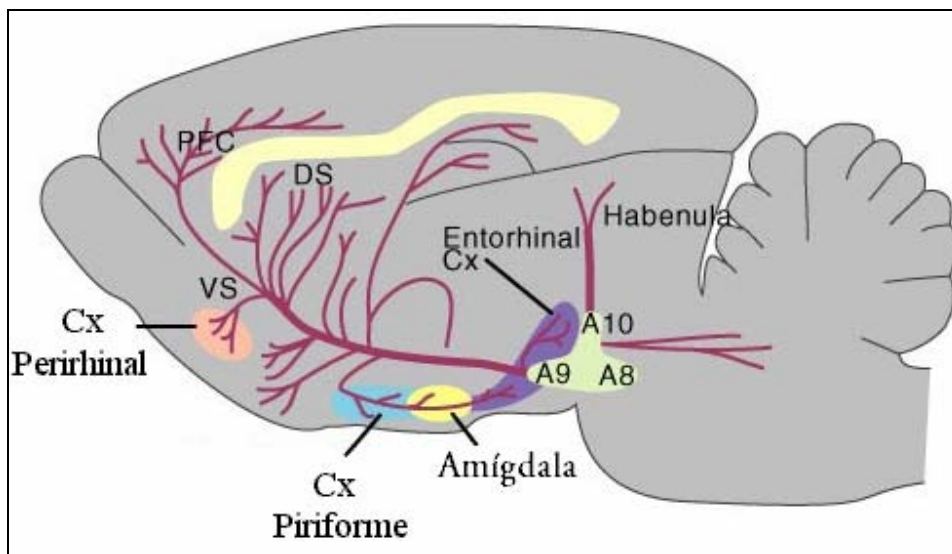
Inicialmente este hecho pretendió plantear la posibilidad de que la autoestimulación pudiera estar mediada por la activación de fibras de paso (localizadas a lo largo del FPM) de índole catecolaminérgico (Wise y Rompre, 1989; Yeomans, 1990; Bauco y Wise, 1994; Salamone et al., 1997; Sokolowski et al., 1998). Sin embargo, se ha comprobado que las neuronas de las vías dopaminérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas poseen unas características neurofisiológicas (periodos refractarios, velocidad de conducción, calibre de los axones) que difieren notablemente de las propiedades de las neuronas implicadas en la recompensa y que se han descrito anteriormente (Shizgal y Murray, 1989; Wise y Rompre, 1989; Yeomans, 1990). Así pues, parece probable que el efecto reforzante de la Autoestimulación Eléctrica Intracerebral pueda no deberse a la activación directa de estas fibras (Yeomans, 1990), aunque siempre es posible que el sistema dopaminérgico pueda activarse de forma trans-sináptica. En este contexto, algunas investigaciones apuntan que las denominadas fibras descendentes relevantes para la recompensa, podrían conectar a nivel del Mesencéfalo o en general, del Tronco Cerebral, con el sistema dopaminérgico mesolímbico, utilizando las proyecciones colinérgicas, dopaminérgicas o gabaérgicas que proyectan desde el Núcleo Pedúnculopontino hasta el Área Tegmental Ventral (Gallistel, 1976; Yeomans, 1982; Wise y Rompré, 1989; Yeomans et al., 1993; Yeomans y Baptista, 1997; Nakahara et al., 2001).

Estos resultados se han visto confirmados a través de estudios neurofarmacológicos en los que se muestra un deterioro en la tasa de AEIC tras la administración de antagonistas noradrenérgicos (como la yohimbina) que produce un desplazamiento hacia la izquierda de la curva tasa-frecuencia (facilitación de la AEIC), mientras que por el contrario, la administración de agonistas noradrenérgicos (agonista de los receptores noradrenérgicos alfa-2), como la clonidina, reduce el efecto reforzante de la AEIC (Wise y Rompre, 1989). Este efecto de la clonidina es muy similar al observado con la administración de antagonistas dopaminérgicos, por lo que se ha considerado que podría actuar inhibiendo el sistema dopaminérgico (Stellar y Rice, 1989).

Por otra parte distintos estudios muestran que los sistemas colinérgicos, pueden constituir el sustrato principal de la estimulación eléctrica del FPM (Shizgal y Murray, 1989). En efecto, la estimulación eléctrica del Hipotálamo Lateral incrementa los niveles de **acetilcolina** en el ATV (Rada et al., 2000) y el bloqueo de los receptores muscarínicos en esta área, atenúa la tasa de AEIC en el FPM (Kofman et al., 1990). Asimismo, la activación o desactivación del autorreceptor colinérgico en el Núcleo Pedúnculopontino modula la

estimulación recompensante cerebral (Yeomans et al., 1993). Este hecho ha llevado a algunos autores a considerar que las fibras descendentes del FPM implicadas en el procesamiento reforzante, podrían activar el sistema dopaminérgico mesolímbico indirectamente a través de la activación de la proyección colinérgica que va desde el Núcleo Pedúnculo pontino al ATV.

Con respecto a la **dopamina**, su localización anatómica coincide con los lugares mesencefálicos en los que la AEIC alcanza sus máximos y cuyos umbrales son mínimos (ver Figura 4) (Corbett y Wise, 1980). Sin embargo, la extensión del sistema de recompensa no siempre se corresponde con las regiones con innervación dopaminérgica (Prado-Alcala y Wise, 1984). Así por ejemplo, existen regiones cerebrales en las que se ha podido inducir AEIC (Bulbo Raquídeo, Cerebelo o Protuberancia), en las que no existe constancia de la presencia de fibras dopaminérgicas (Yeomans, 1990).



**Figura 4.** Sistema dopaminérgico mesotelencefálico. Abreviaturas: A8, A9 y A10, grupos de células dopaminérgicas A8, A9 y A10; Cx, Córtex; VS, Estríado Ventral; DS, Estríado dorsal; PFC, Córtex Prefrontal (Adaptado de Robbins y Everitt, 2002).

En cualquier caso, una mayoría de las investigaciones neurofarmacológicas, sugieren que la dopamina desempeña un importante papel en el sistema de recompensa cerebral. Concretamente, la administración de antagonistas dopaminérgicos como los neurolépticos, producen, usando dosis bajas, un desplazamiento hacia la derecha de la curva

tasa-frecuencia (descenso en el refuerzo) mientras que con dosis elevadas, da lugar a un descenso en dicha curva, algo que puede ser explicado como un posible indicador de la aparición de alteraciones motoras. Por el contrario, la administración de agonistas como las anfetaminas o cocaína en el Núcleo Accumbens, facilita los efectos recompensantes de la estimulación del FPM, incrementando la respuesta de AEIC y disminuyendo el umbral de estimulación. Concretamente se observa un desplazamiento hacia la izquierda de la función tasa de respuesta-intensidad (ver Figura 2) (Gallistel y Karras, 1984; Miliaressis et al., 1986; Stellar y Rice, 1989; Wise y Rompré, 1989; Carlezon y Wise, 1993).

En resumen se puede concluir que, aunque la Autoestimulación Eléctrica Intracerebral no parece activar las fibras dopaminérgicas directamente (Shizgal y Murray, 1989), éstas podrían desempeñar un papel fundamental en la modulación de las vías de recompensa intracerebrales.

Finalmente existen datos que apoyan la implicación de péptidos **opiáceos** en el refuerzo inducido por AEIC (Jenck et al., 1987; Carlezon y Wise, 1993; Bielajew et al., 2003). En este sentido, el efecto de la administración de antagonistas opiáceos es dependiente de la localización del electrodo de estimulación y del método utilizado para comprobar los cambios en la conducta. Así se ha comprobado que el tratamiento con naloxona induce cambios a largo plazo en el umbral de estimulación eléctrica reforzante del ATV, al tiempo que desplaza la curva respuesta-frecuencia hacia la derecha aunque no llega a suprimir el desarrollo conductual (Bielajew et al., 2003).

Más aún, estos péptidos opiáceos, que suelen estar presentes en distintas áreas dopaminérgicas (Stellar y Rice, 1989), podrían mediar la acción reforzante de drogas opiáceas como la morfina o la inyecciones de sustancias que actúan sobre los receptores opiáceos  $\mu$  y  $\delta$  (Mucha et al., 1982; Carr et al., 1989; Shippenberg y Elmer, 1998; McBride et al., 1999). Igualmente se ha comprobado que la administración de morfina en el ATV produce un aumento en la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas, facilitando la AEIC (desplaza la curva tasa respuesta-frecuencia, hacia la izquierda) (Olds y Forbes, 1981), además de revertir el efecto atenuante que ejercen los neurolépticos (Wise y Rompre, 1989). Este efecto facilitador de la morfina sobre la conducta de autoestimulación queda bloqueado al lesionar el ATV con 6- hidroxidopamina (6-OHDA) (neurotoxina específica para la dopamina) (Hand y Franklin, 1985). Los opiáceos actuarían inhibiendo a GABA (Johnson y North, 1992; Vaughan et al., 1997), originando así una desinhibición del sistema

dopaminérgico (Johnson y North, 1992), con lo cual el efecto reforzante de la morfina y la facilitación de la AEIC se podría deber a una actuación indirecta de estas sustancias sobre los sistemas dopaminérgicos (Wise y Rompre, 1989; Wise, 1994; 1996b; Tsuji et al., 1996).

No puede descartarse, sin embargo, que los opiáceos también pueden ejercer sus efectos reforzantes independientemente del sistema dopaminérgico (van Ree y Ramsey, 1987; Koob, 1992). Por ejemplo, se ha comprobado que la administración de morfina en el Núcleo Accumbens (Nacc) induce preferencias espaciales en una tarea de condicionamiento de preferencia por un lugar (van der Kooy et al., 1982) y ello con independencia del sistema dopaminérgico.

### **1.2.2. EL CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIA POR UN LUGAR (CPP) Y LA ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS DE ABUSO, COMO MÉTODO DE ESTUDIO DE LOS MECANISMOS NEUROFARMACOLÓGICOS IMPLICADOS EN EL SISTEMA DE RECOMPENSA CEREBRAL.**

Los datos presentados hasta ahora demuestran que la administración de sustancias de abuso afecta a la recompensa inducida por la Estimulación Eléctrica Intracerebral. Asimismo y al igual que la estimulación eléctrica reforzante, distintas investigaciones han demostrado que la mayoría de las drogas de abuso (anfetaminas, cocaína, opiáceos  $\mu$  y  $\delta$ , nicotina, fenciclidina, etanol y cannabis) provocan un aumento en la concentración de los niveles de dopamina en las terminales dopaminérgicas mesencefálicas, incluyendo el NAcc (para revisión ver Wise y Rompre, 1989; Wise, 1996b; McBride et al., 1999). Todo ello, ha hecho que el estudio de los efectos reforzantes inducidos por la administración de la mayoría de las sustancias de abuso constituya una herramienta útil para intentar determinar los mecanismos neuro-farmacológicos implicados en la recompensa cerebral. Uno de los procedimientos conductuales más utilizados para su estudio es el **condicionamiento de preferencias por un lugar (CPP)** (Bozarth y Wise, 1982; Mucha et al., 1982; Phillips y Fibiger, 1987; Carr et al., 1989; Bals-Kubik et al., 1993; Shippenberg et al., 1993; Bardo et al., 1995; Schechter y Calcagnetti, 1998; Shippenberg y Elmer, 1998; Tzschentke, 1998; McBride et al., 1999; van Ree et al., 1999; Bardo y Bevins, 2000; Delamater et al., 2000; Papp et al., 2002). En este paradigma de aprendizaje el efecto fisiológico y las propiedades motivacionales derivadas de la administración de un tratamiento, son asociadas a través de



la presentación en contigüidad temporal con los estímulos externos, inicialmente neutros, de un determinado contexto. Durante el transcurso del condicionamiento estos índices ambientales van adquiriendo una valencia emocional o motivacional, de manera que posteriormente cuando el animal es expuesto ante dichos estímulos se observa un incremento o descenso del tiempo que permanece aproximándose y manteniendo el contacto con ellos (dependiendo de la naturaleza reforzante o aversiva del tratamiento empleado), frente a un segundo conjunto de estímulos que nunca ha sido asociado al tratamiento (Figura 5) (Schechter y Calcagnetti, 1998; Shippenberg y Elmer, 1998; Tzschentke, 1998; Arnould y Agmo, 1999; Bardo y Bevins, 2000; Spiteri et al., 2000).



**Figura 5.** Laberinto en corredor para el condicionamiento de preferencias por un lugar (CPP).

Así se ha comprobado que una amplia variedad de reforzadores naturales como agua, comida, soluciones dulces... (Bechara et al., 1992; Stefurak y Van der Kooy, 1992; 1994; Lepore y Franklin, 1996; Perks y Clifton, 1997; Delamater et al., 2000; Schroeder y Packard, 2000; Spiteri et al., 2000; Papp et al., 2002) y artificiales (estimulación eléctrica intracerebral, sustancias de abuso) (Bozarth, 1987a; Phillips y Fibiger, 1987; van der Kooy, 1987; Bechara y Van der Kooy, 1992a, b; Bals-Kubik et al., 1993; Bechara et al., 1993; Jaeger y Van der Kooy, 1993; 1996; Olmstead y Franklin, 1993; 1997; Museo y Wise, 1994; Nader y Van der Kooy, 1994; Bardo et al., 1995; Shippenberg y Bals-Kubik, 1995; Maldonado et al., 1997; Ikemoto y Panksepp, 1999; Spiteri et al., 2000; Papp et al., 2002... para una revisión, consultar Schechter y Calcagnetti, 1998; Shippenberg y Elmer, 1998; Tzschentke, 1998; McBride et al., 1999; Van Ree et al., 1999) provocan preferencias condicionadas por los estímulos ambientales o espaciales con los que previamente han sido asociados. Por otra parte, también se han observado aversiones condicionadas al lugar en respuesta a tratamientos que provocan efectos aversivos como la administración de cloruro de litio o de antagonistas opiáceos, o ante las consecuencias motivacionales aversivas

derivadas del síndrome de abstinencia en animales tras el uso prolongado de sustancias de abuso como la morfina (Mucha et al., 1982; Spanagel et al., 1992; Reilly et al, 1993; Bals-Kubik et al., 1993; Shippenberg y Bals-Kubik, 1995; Schechter y Calcagnetti, 1998; Shippenberg y Elmer, 1998; Tzschentke, 1998; Papp et al., 2002).

Aunque existen diversos planteamientos conceptuales, la mayoría de los autores consideran que los mecanismos de aprendizaje subyacentes al condicionamiento espacial están regidos por los principios del **condicionamiento clásico** (Bardo et al., 1995; Shippenberg y Elmer, 1998; Tzschentke, 1998; Van Ree et al., 1999; Bardo y Bevins, 2000), a pesar de que las respuestas efectuadas (por ejemplo la aproximación y permanencia en un contexto determinado) son de índole instrumental.

Cuando los estímulos incondicionados empleados son reforzadores naturales y éstos están disponibles en el contexto donde se establece el aprendizaje de preferencias por un lugar, el proceso de condicionamiento es más complejo. En este caso el estímulo incondicionado constituye una recompensa natural en sí mismo por lo que genera respuestas de aproximación. Pero además, el contacto directo con dicho estímulo puede desencadenar la ejecución de conductas consumatorias, las cuales irán seguidas de una respuesta hedónica derivada de las propiedades intrínsecamente reforzantes del acto consumatorio o de las reacciones fisiológicas que siguen al consumo de la recompensa. Por tanto se pueden establecer dos tipos de asociaciones, por una parte, entre las propiedades de incentivo condicionadas del estímulo reforzante y las claves ambientales (similar al descrito con otros reforzadores) y por otro lado, entre la reacción afectiva asociada a las respuestas consumatorias o a los efectos derivados del consumo de dicho estímulo y los índices espaciales (Tzschentke, 1998; Arnould y Agmo, 1999; Spiteri et al., 2000).

En ambos casos la respuesta instrumental observada es la conducta de aproximación y un mayor tiempo de permanencia en el lugar asociado a la obtención de la recompensa, pero según algunos autores, los procesos subyacentes serían distintos de forma que, las respuestas de aproximación condicionada estarían relacionadas con el proceso de atribución de incentivo mientras que en el caso de la reacción afectiva condicionada mediarían las propiedades hedónicas o el proceso descrito por algunos autores como “liking” (Berridge, 1996; Berridge y Robinson, 1998; Spiteri et al., 2000). En este sentido, estudios llevados a cabo mediante este procedimiento han permitido comprobar que si se manipulan las propiedades hedónicas del estímulo incondicionado, a través de la reducción de su valor reforzante mediante cambios en el estado motivacional del animal (estados de

déficit o saciedad) o a través de un procedimiento de aversión condicionada, el animal es capaz de adaptar su conducta mostrando una reducción del tiempo que permanece en el lugar asociado a dicho estímulo (Perks y Clifton, 1997).

Pero el desarrollo del condicionamiento de preferencias espaciales no sólo **depende de las propiedades afectivas del estímulo incondicionado**, también va a estar en función de la **capacidad del animal para aprender la asociación** entre el estímulo condicionado e incondicionado, así como para **recordar y expresar el conocimiento** adquirido, el día de Test o prueba de preferencia (White et al., 1987; Carr et al., 1989; Olmstead y Franklin, 1997; Schroeder y Packard, 2000). En contraste con la idea inicial de equipotencialidad estimular para cualquier aprendizaje, actualmente se considera que existen determinadas predisposiciones biológicas que favorecen la asociación de ciertos estímulos con unas determinadas consecuencias (García et al., 1985; White et al., 1987; Bures et al., 1998; Welzl et al., 2001). Este es un factor importante puesto que algunos tratamientos reforzantes también poseen propiedades aversivas (por ejemplo, las sustancias psicoactivas), algo que podría afectar al condicionamiento de preferencia por un lugar. Pero, generalmente, parece existir una asociación preferente entre las propiedades aversivas de estas sustancias y el sabor, y entre las propiedades reforzantes y el espacio (White et al., 1987; Turenne et al., 1996; para una revisión ver Carr et al., 1989).

Por otra parte, es bien conocido el hecho de que determinados tratamientos, como la mayoría de las sustancias de abuso o la administración de sacarosa, pueden desarrollar o inhibir los procesos relacionados con la memoria (White et al., 1987; Jaeger y Van der Kooy, 1993; 1996; Nader et al., 1997). Por ejemplo, la administración de un determinado tratamiento, como la morfina, puede actuar potenciando la asociación entre los estímulos condicionado e incondicionado, desarrollando la retención de dicha asociación, incrementando la saliencia del estímulo condicionado o aumentando la capacidad del animal para discriminar entre las claves asociadas al tratamiento o a la sustancia inocua. Por tanto, es importante tener en cuenta que el establecimiento del condicionamiento espacial puede ser debido no sólo a la capacidad reforzante o aversiva de un determinado tratamiento sino que también puede ser provocado por la capacidad de dicho tratamiento para modular cualquiera de los procesos mencionados (Olmstead y Franklin, 1997).

En relación con este último factor se encuentra “el efecto de estado-dependencia” que pueden provocar algunos tratamientos. Este hecho se refiere a que el conocimiento o la

respuesta que ha sido aprendida o adquirida mientras el animal se encontraba en un determinado estado (por ejemplo bajo los efectos de una determinada droga o en un estado motivacional concreto), sólo puede ser recordada o reproducida cuando el animal está en ese mismo estado, pero no cuando se encuentra en un estado diferente. Aunque la mayoría de los estudios no controlan este posible efecto, llevando a cabo el test de preferencia por un lugar en unas condiciones distintas a las establecidas durante la adquisición del condicionamiento, este hecho puede interferir con los resultados obtenidos por lo que es una variable a considerar (Tzschentke, 1998).

Por último, destacar otra de las peculiaridades del condicionamiento de preferencias por un lugar. En este procedimiento el **tratamiento** (estímulo incondicionado) **es recibido** de forma pasiva **por el animal**. Este hecho establece una clara distinción con respecto a otros protocolos como el de autoadministración, o AEIC, en el cual la experiencia con el tratamiento está bajo el control del animal (Bardo y Bevins, 2000). En relación con este aspecto, recientes investigaciones muestran que la capacidad de un tratamiento para activar el sistema dopaminérgico mesolímbico (ampliamente relacionado con la recompensa) depende, al menos en parte, de si éste es administrado pasivamente por el investigador o está bajo el control operante del animal. En general existe un aumento en la liberación de dopamina en el NAcc cuando la administración del tratamiento está bajo el control del animal, observándose un descenso en la respuesta dopaminérgica cuando éste es administrado por el investigador (Garris et al., 1999; para una revisión reciente ver Bardo y Bevins, 2000).

Con respecto al tipo de tratamiento utilizado, como se ha mencionado anteriormente el condicionamiento de preferencia por un lugar constituye uno de los procedimientos conductuales más utilizados para el estudio de las propiedades reforzantes condicionadas de la mayoría de las sustancias de abuso (Bozarth, 1987a; van der Kooy, 1987; Carr et al., 1989; Bals-Kubik et al., 1993; Olmstead y Franklin, 1997; Shippenberg y Elmer, 1998; Tzschentke, 1998; McBride et al., 1999; Van Ree et al., 1999; Gerrits et al., 2003). En general, mediante este procedimiento se ha comprobado que la mayoría de las sustancias que generan adicción en humanos, como los opiáceos, las benzodiazepinas, los psicoestimulantes, el alcohol, la nicotina, etc, son las mismas que producen una preferencia por un lugar condicionada en animales (Phillips y Fibiger, 1987; Carr et al., 1989; Schechter y Calcagnetti, 1998; Tzschentke, 1998; McBride et al., 1999; Papp et al., 2002), mientras que las drogas que no provocan adicción como los neurolépticos, los

antidepresivos, los antihistamínicos..., tampoco inducen CPP (Carr et al., 1989; Schechter y Calcagnetti, 1998; Tzschentke, 1998).

Una vez más, la mayoría de los datos aportados por las distintas investigaciones implican al sistema dopaminérgico mesocorticolímbico en la mediación del efecto reforzante de las sustancias de abuso (Phillips y Fibiger, 1987; Spanagel et al., 1992; Bals-Kubick et al., 1993; Shippenberg et al., 1993; Herz y Spanagel, 1995; Beninger y Milner, 1998; Shippenberg y Elmer, 1998; Tzschentke, 1998; McBride et al., 1999; Sell et al., 1999; Bardo y Bevins, 2000; Everitt et al., 2001). En este sentido, existe evidencia sobre la probabilidad de una estrecha correlación entre la capacidad de un tratamiento para inducir condicionamiento de preferencia por un lugar y el hecho de que pueda provocar un aumento en la neurotransmisión dopaminérgica (Carr et al., 1989; Herz y Spanagel, 1995; Tzschentke, 1998). Así, en estudios con animales se ha comprobado que la exposición a estímulos previamente asociados con sustancias de abuso, provoca un aumento en la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas localizadas en el ATV, potencia la liberación de dopamina en el Nacc y modula la actividad cerebral en distintas áreas del sistema dopaminérgico ascendente (Sell et al., 1999). Por otra parte, se ha demostrado también que las lesiones del sistema dopaminérgico o la administración de antagonistas dopaminérgicos bloquean el condicionamiento de preferencia por un lugar inducido por las diferentes drogas de abuso (Bozarth y Wise, 1982; Carr et al., 1989; Shippenberg et al., 1993; Maldonado et al., 1997; Beninger y Miller, 1998; Tzschentke, 1998; Laviolette et al., 2002; Zarrindast et al., 2003).

También existe evidencia, no obstante, que apoya la implicación del sistema dopaminérgico en la motivación de tipo aversivo (Hoebel y Novin, 1982; Salamone, 1994; Turenne et al., 1996; Besson y Louilot, 1997; Salamone et al., 1997; Louilot y Besson, 2000; Ikemoto y Panksepp, 1999; Kelley y Berridge, 2002; Young, 2004). Así, se ha comprobado que, la presencia de estímulos estresantes provocan una liberación de opiáceos y sustancia P, que dan lugar a la activación del sistema dopaminérgico (Le Magnen et al., 1980; Franklin, 1998; Altier y Stewart, 1999; Lapeyre et al., 2001). También se ha visto que por ejemplo, la presentación de un estímulo condicionado aversivo (tono que ha sido previamente asociado a choques eléctricos en las patas) provoca un incremento en los niveles de dopamina extracelular en el Núcleo Accumbens (Young, 2004). Por otra parte, se ha comprobado que incluso la administración de algunas drogas de abuso como los opiáceos o las anfetaminas produce efectos tanto reforzantes como aversivos y concretamente, se ha

demostrado que estas sustancias pueden inducir preferencias por un lugar en un procedimiento de apredizaje de CPP, y condicionamiento aversivo gustativo en tareas de discriminación gustativa (Turenne et al., 1996). Ambos efectos parecen estar mediados por el mismo sistema: El sistema dopaminérgico mesolímbico, ya que la interferencia de este sistema mediante el empleo de antagonistas dopaminérgicos, atenúa tanto los efectos aversivos como los reforzantes inducidos por las anfetaminas (Turenne et al., 1996).

Para explicar estos resultados se han propuesto varias posibilidades. Así por ejemplo, algunos autores sugieren que el sistema dopaminérgico mesolímbico, más que mediar específicamente la aversión o el refuerzo, estaría implicado en funciones generales tales como integración sensoriomotora o la atención (Salamone, 1994; Gray et al., 1997; Shippenberg y Elmer, 1998; Kelley y Berridge, 2002; Cannon y Palmiter, 2003). Otra alternativa planteada sugiere que en el caso de la motivación aversiva, la dopamina esté implicada en mecanismos de refuerzo negativo, de modo que cualquier conducta que elimine un estado aversivo, resultará reforzante (Rada et al., 1998; Ikemoto y Panksepp, 1999; Rada y Hoebel, 2001; Kelley y Berridge, 2002). Por último la propuesta que una mayoría de los investigadores apoyan, sugiere que el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico estaría directamente implicado en la motivación aversiva aunque de forma distinta a su mediación en el refuerzo (Salamone, 1994; Berridge y Robinson, 1998; Kelley y Berridge, 2002; Young, 2004).

### **Psicoestimulantes: Anfetaminas y cocaína.**

Existe abundante evidencia que confirma que los estimulantes psicomotores como las anfetaminas o la cocaína provocan condicionamiento de preferencia por un lugar (Bozarth, 1987a; Phillips y Fibiger, 1987; White et al., 1987; Carr et al., 1989; Bardo et al., 1995; Bedingfield et al., 1998; Schiltein et al., 1998; Tzschentke, 1998; McBride et al., 1999; Liao et al., 2000; Mueller y Stewart, 2000; Smith et al., 2002).

La mayoría de estos estudios consideran de nuevo que el condicionamiento espacial inducido por la administración de estas sustancias depende de su capacidad para provocar un incremento en los niveles extracelulares de dopamina (Carr et al., 1989; Tzschentke, 1998). Concretamente, los resultados aportados por las distintas investigaciones muestran que los efectos reforzantes de estas sustancias estarían mediados principalmente en el caso

de las anfetaminas, por los receptores dopaminérgicos  $D_2$  aunque también serían dependientes de la transmisión dopaminérgica mediada por los receptores  $D_1$ . En el caso de la cocaína, los efectos reforzantes dependerían principalmente de los mecanismos mediados por los receptores dopaminérgicos  $D_1$  (Tzschentke, 1998). En este sentido, investigaciones recientes con ratones knockout muestran que la isoforma  $D_2L$  del receptor de dopamina  $D_2$  no es necesaria para la adquisición del condicionamiento de preferencias espaciales inducido por la administración de cocaína (Smith et al., 2002).

A nivel anatómico, el Núcleo Accumbens se puede dividir en tres subregiones claramente diferenciadas, la región ventromedial o capsular, la porción dorsolateral o nuclear y el polo rostral (Záborszky et al., 1985; Heimer et al., 1991; Zahm y Brog, 1992; Ikemoto y Panksepp, 1999). Este núcleo también está considerado como una región heterogénea con respecto a la adquisición del condicionamiento de preferencia por un lugar inducido por la administración de psicoestimulantes (Liao et al., 2000). Las terminales dopaminérgicas del Núcleo Accumbens parecen ser el lugar de acción de las anfetaminas a la hora de inducir el CPP. De hecho se ha comprobado que la administración intracerebral de d-anfetamina en distintas regiones del NAcc (porción nuclear y capsular) produce una preferencia por el lugar con el que ha sido asociada, no observándose este efecto cuando se administra en otras regiones dopaminérgicas como el Córtex Prefrontal, el Estriado, la Amígdala, el Núcleo Caudado o el Área Postrema (Phillips y Fibiger, 1987; White et al., 1987; Carr et al., 1989; Schilhein et al., 1998; Tzschentke, 1998; McBride et al., 1999).

Con respecto a los resultados obtenidos tras la administración de cocaína intra-Accumbens los datos son muy difusos. Son pocos por ejemplo, los estudios que han inducido CPP con la administración intra-Accumbens de cocaína (Liao et al., 2000). Asimismo, y a diferencia de los datos obtenidos con anfetaminas, la administración de neurolépticos o las lesiones con 6-OHDA de las terminales dopaminérgicas del NAcc, no bloquean el CPP inducido por la administración de cocaína (Phillips y Fibiger, 1987; Carr et al., 1989; Tzschentke, 1998; McBride et al., 1999). Sin embargo, un estudio reciente ha conseguido inducir CPP aunque utilizando altas dosis de cocaína y un elevado número de ensayos de adquisición (doce ensayos) (Liao et al., 2000). Esta última investigación ha permitido establecer una disociación entre las distintas subregiones del NAcc y el condicionamiento de preferencia por un lugar inducido por la administración de microinyecciones de anfetaminas y cocaína: La anfetaminas inducen preferencias por un lugar debido a su acción en la región nuclear del NAcc; mientras que, el CPP inducido con

dosis altas de cocaína, se debe a su efecto sobre la porción capsular de este núcleo (Liao et al., 2000).

Una de las estructuras relacionadas con el NAcc es el Pálido Ventral (PV) y algunos estudios han demostrado la posible participación de esta estructura en el efecto reforzante tanto de la cocaína como de las anfetaminas (Gong et al., 1997; Tzschentke, 1998). Así, un estudio llevado a cabo por Gong y colaboradores ha demostrado que la administración intraperitoneal de cocaína provoca un aumento de los niveles dopaminérgicos en el Pálido Ventral, efecto que correlaciona de forma significativa con la inducción de preferencias por el lugar con el que ha sido asociada (Gong et al., 1997). Asimismo, las lesiones del Pálido Ventral rostral con 6-OHDA, bloquean el desarrollo del CPP provocado por la administración sistémica de cocaína (Gong et al., 1997). Estos datos junto con otros estudios relacionados (para una revisión ver Tzschentke, 1998; McBride et al., 1999) sugieren que la inervación dopaminérgica que proyecta desde el ATV hasta el PV rostral puede desempeñar un papel importante en relación a las propiedades reforzantes de los psicoestimulantes.

Por último, otra estructura que ha sido relacionada con las preferencias por un lugar inducidas por la administración de cocaína es el Complejo Amigdalino (Brown y Fibiger, 1993). Lesiones completas de esta estructura bloquean las preferencias por un lugar inducidas por la administración de cocaína, sin alterar el efecto estimulante psicomotor que estas sustancias provocan.

En conclusión, los efectos reforzantes de la cocaína y las anfetaminas parecen estar mediados, al menos en cierta medida, por diferentes receptores dopaminérgicos y por sustratos neuroanatómicos parcialmente distintos (Tzschentke, 1998; McBride et al., 1999; Liao et al., 2000).

## **Opiáceos.**

Son numerosas las investigaciones llevadas a cabo la tarea de condicionamiento de preferencia por un lugar que demuestran que la administración de agonistas de los receptores opiáceos provocan efectos reforzantes o aversivos dependiendo del tipo de receptor con el que interactúen [ $\mu$  ( $\mu$ ),  $\kappa$  ( $\kappa$ ),  $\delta$  ( $\delta$ )] (Bals-Kubick et al., 1993; Shippenberg et al., 1993; Shippenberg y Elmer, 1998; Tzschentke, 1998; McBride et al.,



1999). Los agonistas de los receptores opioides  $\mu$  y  $\delta$ , como la heroína, la morfina o el fentanilo, actúan como estímulos reforzantes provocando una marcada preferencia, dosis dependiente, por el lugar asociado a su administración (Mucha et al., 1982; Carr et al., 1989; Bals-Kubick et al., 1993; Shippenberg et al., 1993; Bardo et al., 1995; Herz y Spanagel, 1995; Tsuji et al., 1996; Shippenberg y Elmer, 1998; Van Ree et al., 1999). Por el contrario, el bloqueo de los receptores opiáceos  $\mu$  induce aversión espacial (Mucha et al., 1982; para una revisión ver Van Ree et al., 1999). Por otra parte, los animales evitan de una forma activa los estímulos ambientales que han sido previamente asociados con la administración de agonistas  $\kappa$ , lo cual sugiere que la activación de estos receptores puede inducir un estado aversivo (Bechara y van der Kooy, 1987; Bals-Kubick et al., 1993; Shippenberg et al., 1993; Herz y Spanagel, 1995; Shippenberg y Elmer, 1998; Van Ree et al., 1999).

Existen numerosos estudios que relacionan al sistema dopaminérgico mesolímbico con el efecto reforzante condicionado de los agonistas opiáceos  $\mu$  (Johnson y North, 1992; Spanagel et al., 1992; Shippenberg et al., 1993; Tsuji et al., 1996; Shippenberg y Elmer, 1998; Tzschentke, 1998; McBride et al., 1999; Van Ree et al., 1999; Manzanedo et al., 2001; Laviolette et al., 2002). Dentro de este sistema, el ATV ha sido una de las estructuras más relacionada con el inicio y el mantenimiento de los efectos reforzantes de los opiáceos (Bozarth, 1987a; Phillips y Fibiger, 1987; Bals-Kubick et al., 1993; Olmstead y Franklin, 1997; Shippenberg y Elmer, 1998; McBride et al., 1999; Van Ree et al., 1999). La administración de agonistas opiáceos  $\mu$  en esta región provoca una marcada preferencia por el lugar con el que ha sido asociada (Bozarth, 1987a; Bals-Kubick et al., 1993; Jaeger y van der Kooy, 1996; Tsuji et al., 1996; Olmstead y Franklin, 1997; van Ree et al., 1999). Sin embargo la infusión de estas sustancias en regiones laterales o dorsales a ésta, no provoca la respuesta condicionada de preferencia, por lo que algunos autores sugieren que la activación de los receptores de opiáceos  $\mu$  localizados en el ATV, es suficiente para el establecimiento del condicionamiento por un lugar (Bozarth, 1987a; Bals-Kubick et al., 1993; Olmstead y Franklin, 1997). En este sentido, Olmstead y Franklin comprobaron que el bloqueo selectivo de los receptores opiáceos del ATV bloqueaba el condicionamiento de preferencia por un lugar inducido por la administración sistémica de morfina, comprobándose así que estos receptores son necesarios para el establecimiento de dicha respuesta (Olmstead y Franklin, 1997).

Van der Kooy y su grupo, por su parte, demostraron que el sustrato neural que sustenta los efectos motivacionales de la morfina, es distinto al que subyace a la capacidad

que tiene esta sustancia para generar unas condiciones interoceptivas específicas que pueden actuar como estímulo predictivo discriminativo. Estos autores comprobaron que la administración de morfina en el ATV pero no en el Complejo Parabraquial (NPB), inducía la respuesta de CPP y en cambio, la infusión de morfina en el NPB pero no en el ATV, actuaba como estímulo predictivo para la adquisición de una tarea de aprendizaje de discriminación gustativa (Jaeger y van der Kooy, 1996).

El mecanismo a través del cual la administración de morfina induce preferencias por un lugar en el ATV ha sido estudiado por Tsuji y colaboradores, quienes han demostrado que un descenso en la neurotransmisión que afecta a los receptores GABA<sub>B</sub> en el ATV es crucial para la expresión de los efectos reforzantes de la morfina (Tsuji et al., 1996). En este estudio, la administración de un agonista de los receptores GABA<sub>B</sub> en el ATV, suprime de forma dosis dependiente, la preferencia por un lugar inducida por la administración de morfina, efecto que es revertido por el tratamiento con un antagonista GABA<sub>B</sub>, pero no con antagonistas de receptores GABA<sub>A</sub>. De acuerdo con otros estudios que han demostrado que la morfina actúa sobre neuronas no dopaminérgicas (más concretamente sobre neuronas gabaérgicas) para estimular las células dopaminérgicas del ATV (Johnson y North, 1992), Tsuji y colaboradores proponen que la morfina genera un descenso en la neurotransmisión mediada por los receptores GABA<sub>B</sub> en el ATV, a través de la hiperpolarización de las aferentes gabaérgicas que recibe. Esto permite la activación de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas y consecuentemente, un incremento en la liberación de dopamina en el Nacc por desinhibición, lo que podría contribuir a la expresión de los efectos reforzantes de la morfina (Tsuji et al., 1996).

Otras áreas que han sido relacionadas con la inducción de preferencias por un lugar a través de la administración de sustancias opiáceas como la morfina son el Núcleo Accumbens (NAcc), Hipotálamo Lateral (HL), la Sustancia Gris Periacueductal (PAG), el Hipocampo, el Área Preóptica Medial, el Fórnix, el Córtex Prefrontal Medial Infralímbico y el Núcleo Pedúnculo Pontino Tegmental (NPPTg) (Bechara y Van der Kooy, 1989; 1992a; Bals-Kubick et al., 1993; Olmstead y Franklin, 1993; 1994; 1997; Tzschentke y Schmidt, 1999; para una revisión consultar Shippenberg y Elmer, 1998; Van Ree et al., 1999). Los resultados obtenidos con respecto al Nacc son contradictorios ya que si bien algunos estudios muestran una inducción de preferencias por un lugar tras la administración de morfina intra-Accumbens, otros por el contrario, aportan resultados negativos tanto en el caso de la infusión de morfina, como también con otros agonistas de los receptores de

opiáceos  $\mu$ , como el DAMGO (Bals-Kubik et al., 1993; Olmstead y Franklin, 1997b; Schiltein et al., 1998; Shippenberg y Elmer, 1998; van Ree et al., 1999). Por ello algunos autores consideran que los resultados positivos obtenidos en algunos de estos estudios pueden ser debidos a que la dosis utilizada de morfina ha podido ser muy elevada y que el efecto reforzante de la morfina pudo iniciarse por la difusión de ésta a los ventrículos (Olmstead y Franklin, 1997). Resultados similares se han obtenido en relación con el HL y en el Hipocampo, por lo que serán necesarias nuevas investigaciones que determinen su implicación en el refuerzo inducido por opiáceos. Olmstead y Franklin, mediante la administración de microinyecciones de morfina en distintas áreas cerebrales, demostraron que sólo la PAG y el ATV fueron suficientes para inducir el condicionamiento de preferencias por un lugar (Olmstead y Franklin, 1997b).

Por el contrario, diversos estudios han demostrado que lesiones con 6-OHDA del Nacc eliminan las preferencias por un lugar inducidas por la administración periférica de morfina (Shippenberg et al., 1993). Este resultado apoya una implicación del sistema dopaminérgico mesolímbico, y mas concretamente de la transmisión neural dopaminérgica en el Nacc, en el efecto reforzante inducido por la administración de agonistas opiáceos  $\mu$ , como la morfina (Shippenberg et al., 1993; Herz y Spanagel, 1995). En este sentido, se ha comprobado que la administración de un inhibidor de la liberación de dopamina (CGS 10746B), también bloquea la inducción de preferencias por un lugar inducidas por la administración de morfina (Manzanedo et al., 2001). Asimismo, estos últimos autores han bloqueado las preferencias por un lugar inducidas por morfina, administrando antagonistas de los receptores dopaminérgicos  $D_1$ ,  $D_2$  y  $D_4$ ; sin obtener este mismo efecto tras la administración de antagonistas de receptores  $D_3$ . Éstos últimos si bloquean sin embargo, la hiperactividad inducida por la administración de morfina. Conjuntamente estos datos sugieren que son los distintos subtipos de receptores dopaminérgicos los que desempeñan un papel fundamental en lo relacionado con el aspecto incentivo del refuerzo opiáceo del cual depende el condicionamiento de preferencia por un lugar que estas sustancias provocan (Manzanedo et al., 2001). A nivel anatómico concretamente, otros autores sugieren que son los receptores dopaminérgicos  $D_1$  localizados en el Núcleo Central de la Amígdala los que podrían ser cruciales en la adquisición y la expresión de las preferencias por un lugar provocadas por la administración periférica de morfina (Zarrindast et al., 2003).

Por otra parte, existen investigaciones que muestran que la administración de morfina puede inducir aversión hacia un lugar asociado a su administración (Bechara et al.,

1993; van Ree et al., 1999). Autores como Van der Kooy y su grupo consideran que la estimulación de receptores opiáceos periféricos, puede ser la responsable de estos efectos aversivos (Bechara y van der Kooy, 1987; Bechara et al., 1987). En uno de los estudios que llevaron a cabo se comprobó que, mediante la administración intraperitoneal de dosis muy bajas de morfina se podía inducir condicionamiento aversivo hacia un lugar. Este efecto fue bloqueado mediante la lesión de una de las estructuras pontinas que recibe información vagal procedente de la periferia, el Núcleo Parabraquial Lateral (Bechara et al., 1993). Otra de las estructuras que ha sido propuesta para la mediación de las propiedades motivacionales aversivas de la morfina y que mantiene conexiones anatómicas con el NPBL es la Corteza Insular Agranular (Zito et al., 1988). En el estudio llevado a cabo por estos autores se comprobó que el condicionamiento espacial aversivo inducido por la administración intraperitoneal de bajas dosis de morfina, podía ser bloqueado eliminando la inervación dopaminérgica de esta estructura con 6-OHDA, comprobando además que esta lesión no afectaba al condicionamiento de preferencias por un lugar inducido por la administración de dosis más altas de morfina.

Los efectos motivacionales aversivos inducidos por los opiáceos han sido relacionados con los receptores opiáceos  $\kappa$  (Bals-Kubick et al., 1993; Herz y Spanagel, 1995; Shippenberg y Elmer, 1998; Tzschentke, 1998; Van Ree et al., 1999). Distintos estudios muestran que la administración de agonistas opiáceos  $\kappa$  provoca una marcada aversión hacia el lugar previamente asociado a su administración (Bals-Kubik et al., 1993; Shippenberg et al., 1993; Herz y Spanagel, 1995; Shippenberg y Elmer, 1998; Tzschentke, 1998; Van Ree et al., 1999). Concretamente, Bals-Kubick y su grupo demostraron que la activación de los receptores opiáceos  $\kappa$  localizados en el ATV o en el NAcc mediante la administración de microinyecciones de agonistas selectivos de estos receptores (U50488H) o de un derivado de la dinorfina (E-2078), era suficiente para inducir un estado aversivo que a nivel conductual provocará aversión hacia el lugar asociado a su administración. Sin embargo, la administración de estas sustancias en áreas adyacentes a estas regiones cerebrales, como el Núcleo Caudado Putamen o la Sustancia Negra, no provoca ningún efecto. Otras estructuras en las que se ha demostrado que la administración de agonistas opiáceos  $\kappa$  induce respuestas de aversión condicionada al lugar son el Córtex Prefrontal Medial y el Hipotálamo Lateral (Bals-Kubik et al., 1993), lo cual sugiere una posible implicación en el establecimiento del condicionamiento aversivo y en estados motivacionales aversivos (Shippenberg y Elmer, 1998).

Estudios llevados a cabo posteriormente han demostrado que la transmisión dopaminérgica en el NAcc y no en otras estructuras como el Caudado, Putamen o el Córtex Prefrontal Medial, es necesaria para la manifestación de los efectos motivacionales aversivos de los opiáceos (Shippenberg et al., 1993; Herz y Spanagel, 1995). Shippenberg y su grupo comprobaron que la lesión del NAcc mediante microinyecciones bilaterales de 6-OHDA o el bloqueo de los receptores dopaminérgicos D1 mediante la administración de antagonistas como el SCH 23390 intra-Accumbens, bloqueaba los efectos motivacionales aversivos inducidos por la administración de agonistas opiáceos  $\kappa$ , eliminando así la respuesta de aversión hacia un lugar que estas sustancias provocan (Shippenberg et al., 1993; Herz y Spanagel, 1995). Según los datos aportados por estas investigaciones, la activación de los receptores opiáceos  $\kappa$  localizados en el NAcc mediante la administración de agonistas, provocaría un descenso en la liberación dopaminérgica que originaría los efectos motivacionales aversivos propios de estas sustancias (Spanagel et al., 1992; Herz y Spanagel, 1995).

Por último, se han estudiado los efectos derivados de la administración de distintos antagonistas opiáceos. Así, se ha demostrado que la administración de un antagonista opiáceo selectivo  $\mu$  (CTOP) o de un antagonista no selectivo como la naloxona, induce una respuesta de aversión condicionada hacia un lugar asociada a su administración tanto en animales opiáceo-dependientes como en sujetos intactos (Mucha et al., 1982; Carr et al., 1989; Shippenberg y Bals-Kubik, 1995; Shippenberg y Elmer, 1998), lo cual sugiere la existencia de una vía de opiáceos endógenos que puede ser activada fásica o tónicamente (Gestreau et al., 2000; Shippenberg y Elmer, 1998). Anatómicamente, se ha demostrado que la administración intra-Accumbens o intra-ATV de estos antagonistas opiáceos provoca aversión espacial condicionada en animales intactos. Más aún, la actividad de las neuronas dopaminérgicas que proyectan desde el VTA al NAcc es necesaria para que se produzcan los efectos aversivos provocados por la administración intra-ATV de estos antagonistas, hecho que no es crucial en el caso de la administración intra-NAcc o sistémica de estos productos (Shippenberg y Bals-Kubik, 1995). Estos autores sugieren por tanto que, aunque la inhibición de la liberación de dopamina que ocurre en respuesta a la administración de antagonistas opiáceos intra-ATV es suficiente para provocar los efectos aversivos de estas sustancias, ésta no es necesaria para la expresión de los efectos motivacionales aversivos de los antagonistas opiáceos.

Investigaciones más recientes llevadas a cabo con ratones knockout han puesto de manifiesto la implicación de los receptores D<sub>2</sub> en el establecimiento del condicionamiento aversivo hacia un lugar provocado por la inducción del síndrome de retirada de la morfina (precipitado con naloxona) y en el condicionamiento de preferencia por un lugar inducido por la administración de morfina (Smith et al., 2002). Estos autores han demostrado que la isoforma D<sub>2L</sub> del receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> es crítica en la adquisición y/ o retención de la asociación estímulo–contexto en el caso de la recompensa inducida por la administración de morfina y la aversión causada por el síndrome de retirada de la morfina.

### **1.3. OTRAS ESTRUCTURAS CEREBRALES DE CARÁCTER APETITIVO.**

Como se ha mencionado anteriormente, el condicionamiento de preferencias por un lugar es considerado por la mayoría de los autores como un ejemplo de condicionamiento clásico que permite a los animales predecir y adaptar su conducta ante eventos futuros en función de su experiencia previa (Bardo et al., 1995; Shippenberg y Elmer, 1998; Tzschentke, 1998; Van Ree et al., 1999; Bardo y Bevins, 2000). Distintas investigaciones revelan que existe una red neural adicional que subyace a esta conducta de aproximación condicionada o condicionamiento clásico apetitivo y de la cual formarían parte estructuras como el Córtex Cingulado Anterior, el Estriado Dorsomedial, la región Nuclear del Núcleo Accumbens y el Núcleo Central de la Amígdala, así como la influencia moduladora del sistema dopaminérgico mesolímbico que se expresaría en el NAcc (Everitt et al., 2001; See, 2002). Las funciones de cada uno de estos núcleos aún no están totalmente definidas pero autores como Everitt y su grupo de Cambridge (2001) sugieren que el área del Cingulo Anterior y la región Nuclear del NAcc podrían formar parte de un circuito cortico-estriado que mediaría estos procesos asociativos pavlovianos y proporcionaría la dirección a las respuestas de aproximación. El área del Cingulo Anterior, a través de sus conexiones con áreas como el Núcleo Estriado Dorsomedial, podría afectar a la expresión conductual del condicionamiento. En este sentido, recientes estudios han demostrado que la lesión del Estriado Dorsomedial (área que recibe aferencias de Áreas Prelímbicas y del Córtex Cingulado Anterior, entre otras) impide principalmente la expresión del condicionamiento de preferencias espaciales, efecto que no se observa cuando se lesiona el Estriado Dorsolateral (Featherstone y McDonald, 2004). Igualmente, distintas investigaciones han demostrado que la subregión nuclear del NAcc estaría directamente relacionada con el

condicionamiento clásico, y particularmente con los aspectos contextuales de los estímulos apetitivos, ya que su lesión deteriora los mecanismos implicados en el aprendizaje y la memoria y por tanto, el establecimiento del condicionamiento y la respuesta de aproximación condicionada pavloviana (Everitt et al., 2001; See, 2002).

Relacionado con este circuito cortical que incluye el área del Cingulo Anterior y el NAcc, se encuentra la Amígdala. Esta estructura ha sido relacionada con distintas formas de condicionamiento tanto aversivo como apetitivo (aprendizaje de incentivo) (McDonald, 1998). Con respecto al condicionamiento clásico apetitivo, los resultados obtenidos en distintos estudios muestran que el Núcleo Central de la Amígdala, desempeñaría un papel fundamental en la adquisición de la conducta de aproximación hacia los estímulos discriminativos que han adquirido propiedades reforzantes mediante su asociación repetida con un reforzador primario (Everitt et al., 2001; See, 2002), mientras que su lesión atenúa esta respuesta condicionada.

El Núcleo Central de la Amígdala, además de recibir información de estructuras corticales sensoriales de orden superior, del área del Cingulo Anterior o del Núcleo Basolateral de la Amígdala (McDonald y Jackson, 1987; para una revisión ver McDonald, 1998), podría estar implicado en la regulación de distintas respuestas autonómicas y endocrinas a través de sus eferencias hacia estructuras como el Hipotálamo o el Tronco Cerebral, así como en distintos procesos de activación o arousal. Algunos autores proponen que las proyecciones del Núcleo Central de la Amígdala a las neuronas dopaminérgicas del ATV (Haber y Fudge, 2000), podrían regular la inervación dopaminérgica del NAcc y por tanto, la activación conductual que vigoriza las respuestas de aproximación. Asimismo, esta regulación dopaminérgica del NAcc podría potenciar el circuito área del Cingulo Anterior – NAcc que proporciona la dirección de la conducta de aproximación (Everitt et al., 2001).

Recientes investigaciones han planteado la posible implicación del Núcleo Basolateral de la Amígdala y la región del Subículo Ventral del Hipocampo en el establecimiento del condicionamiento de preferencias por un lugar. Mediante registros electrofisiológicos se ha demostrado la existencia de una convergencia de aferencias procedentes del Subículo Ventral del Hipocampo y del Núcleo Basolateral de la Amígdala en determinadas neuronas de la parte medial de la región capsular del NAcc. Este hecho plantea la posibilidad de que, en esta región se lleve a cabo la integración y asociación de la información procedente de estas distintas fuentes. Se considera que el Hipocampo está

relacionado con la codificación de la información espacial así como con el establecimiento y almacenamiento de la configuración relacional de los objetos y de los hechos del entorno. Y que el Núcleo Basolateral de la Amígdala, desempeña un papel fundamental en el establecimiento de asociaciones entre reforzadores primarios y estímulos condicionados. Por tanto la convergencia de la información procedente de estas dos fuentes en el NAcc, permitirían a estas células integrar dicha información y responder tanto ante la presencia de un reforzador en una determinada configuración espacial como ante estímulos predictores de una determinada recompensa, generando así las respuestas de aproximación conductual apropiadas propias del condicionamiento de preferencias por un lugar y de las funciones relacionadas con la recompensa del NAcc (French y Totterdell, 2003). Asimismo, se ha demostrado que el Núcleo Basolateral de la Amígdala desempeñaría un papel fundamental en la modulación de los procesos de consolidación de la memoria que subyacen al condicionamiento de preferencias por un lugar inducido por la comida, ya que el bloqueo temporal de esta estructura con lidocaína tras el entrenamiento bloquea la adquisición del CPP, sin que se produzca este efecto cuando la lidocaína se administra previamente al condicionamiento (Schroeder y Packard, 2000).

El Córtex Orbitofrontal también ha sido implicado en el aprendizaje apetitivo (Gallagher et al., 1999; Tremblay y Schultz, 1999; Rolls, 2000; See, 2002). Esta región podría desempeñar un papel fundamental en el control de los procesos motivacionales de la conducta dirigida hacia una meta (Tremblay y Schultz, 1999), en la selección de la respuesta (Gallagher et al., 1999) y en la formación de asociaciones entre estímulos y reforzadores (Rolls, 2000).



## **2. RECOMPENSA Y APRENDIZAJE APETITIVO.**

Como se ha visto hasta el momento, está bien documentado que el sistema de recompensa cerebral constituye el sustrato neural del fenómeno de Autoestimulación Eléctrica Intracerebral (Olds y Milner, 1954) y de los efectos reforzantes de las drogas de abuso (para una revisión ver Berridge y Robinson, 1998; Wise, 2002). Los componentes esenciales de este circuito son el Área Tegmental Ventral (ATV) (origen del sistema dopaminérgico mesolímbico), el núcleo Accumbens (NAcc) que constituye la interfaz entre la motivación y la acción, y el Pálido Ventral situado entre el NAcc y el Hipotálamo Lateral (HL), áreas que por otra parte también han sido implicadas en el control de la ingesta de alimentos (Yamamoto, 2006). Estas investigaciones muestran la existencia de cierta superposición entre el circuito de recompensa cerebral y las vías neurales implicadas en la conducta de la ingesta (Wise y Rompre, 1989; Wise, 1996b; Yamamoto, 2006), así como una interrelación entre la ingesta y distintas sustancias de abuso (Cooper y Higgs, 1994; Bodnar, 1996; Carr, 1996; Gosnell y Levine, 1996; Vaccarino, 1996; Drewnowski, 1997).

### **2.1. APRENDIZAJE GUSTATIVO: PREFERENCIAS Y AVERSIONES GUSTATIVAS.**

El proceso de selección de alimentos está guiado principalmente por la experiencia previa de los sujetos con los distintos nutrientes. Generalmente, cuando un animal ingiere por primera vez una sustancia, muestra neofobia, es decir inicialmente, tiende a rechazar o ingerir con precaución ese nuevo alimento, y solo posteriormente, va aumentando su consumo como consecuencia de las sucesivas exposiciones así como del aprendizaje de que dicha sustancia es segura para su consumo. Mediante este proceso de atenuación de la neofobia los alimentos pueden ser clasificados en nutrientes de carácter familiar aversivo (menos preferidos), novedoso y familiar-seguro (más atractivo/apetitivos). Así los estímulos gustativos novedosos, irían modificando su valor hacia uno u otro de los extremos en

función de la experiencia, hasta ser considerados como familiares y aversivos o apetitivos (Bures et al., 1998).

Este hecho permite que mediante los índices gustativo/olfatorios principalmente, y a partir de sus consecuencias inmediatas o metabólicas que los animales puedan: Evitar por un lado, sustancias cuya ingesta va asociada a malestar y que podrían resultar nocivas para la supervivencia (aprendizaje interoceptivo o aversivo gustativo); y por otra parte, establecer preferencias e ingerir aquellos nutrientes necesarios para mantener el equilibrio homeostático (aprendizaje de preferencias gustativas) (Booth, 1985; Cooper y Higgs, 1996; Bures et al., 1998; Welzl et al., 2001; Saper et al., 2002).

### **2.1.1. APRENDIZAJE DE PREFERENCIAS GUSTATIVAS.**

El Aprendizaje de Preferencias Gustativas resulta especialmente adaptativo, ya que en condiciones de privación o en estados carenciales concretos (ej. déficit en sodio...), nos va a permitir establecer asociaciones entre un determinado sabor y las consecuencias tanto inmediatas (por ejemplo, buen sabor) como posteriores (metabólicas) que de su ingesta se derivan (Parker et al., 1973; Puerto et al., 1976a; b; Puerto y Molina, 1977; Deutsch y Tabuena, 1986; Le Magnen, 1992; 1999; Azzara y Sclafani, 1998; Perez et al., 1998; Spector, 2000). Así, es posible seleccionar en muchos casos, de una forma rápida y con el menor riesgo posible, el alimento adecuado para mantener la homeostasis y los niveles de aminoácidos, vitaminas, proteínas, etc. dentro de unos parámetros fisiológicos normales (Scott, 1990).

Pero los organismos pueden ingerir alimentos no sólo como resultado de un estado de desequilibrio energético interno, sino también en respuesta a las propiedades hedónicas o agradables del alimento, a variables emocionales (por ejemplo estados de estrés, depresión), o ambientales (disponibilidad del alimento, claves relacionadas con la comida, reforzadores alternativos) (Leibowitz, 1982; Rolls, 1982; Siviy et al., 1982; Le Magnen, 1992, 1999; Nencini, 1996; Davis, 1999; Kandel et al., 2000). En cualquier caso, parece claro que uno de los principales factores que modula la capacidad reforzante de la comida es su sabor. Aunque existen diferencias entre especies, generalmente se acepta que los organismos son capaces de detectar cinco sabores básicos: dulce, salado, ácido, amargo y umami. Estos sabores son detectados por las papilas gustativas de la lengua y dicha información es

transmitida por los nervios Facial, Glossofaríngeo y Vago hacia niveles superiores (ver apartado “Bases neuro-anatómicas del aprendizaje aversivo gustativo” de este capítulo, página 48). A nivel central, estudios electrofisiológicos han puesto de manifiesto la existencia de células gustativas primarias localizadas en estructuras cerebrales relacionadas con el procesamiento de los estímulos gustativos, por ejemplo el núcleo Parabraquial o la Corteza Insular (Kiefer y Orr, 1992; Yamamoto et al., 1994; Phillips et al., 1997). Estas células detectan la cualidad sensorial discriminativa del estímulo gustativo (dulce, salado, etc.).

Pero cuando un estímulo gustativo es consumido no sólo se detectan los aspectos estrictamente sensoriales sino que también se perciben aspectos afectivos o reforzantes (si es un sabor apetecible o desagradable) (Sewards, 2004). Una de las interacciones entre los estímulos gustativos es la relacionada directamente con su impacto hedónico e intensidad. La intensidad del estímulo gustativo depende de la concentración, y se ha descrito una relación, en U invertida, entre ésta y su valor afectivo. Así conforme se incrementa su concentración más apetecibles suele ser, hasta un valor máximo de concentración por encima del cual, ese mismo estímulo suele resultar aversivo (Le Magnen, 1992; Drewnowski, 1997).

Las conductas, incluyendo la aceptación o evitación, provocadas por los estímulos gustativos van a depender principalmente de sus propiedades hedónicas, mientras que el reconocimiento del sabor depende del procesamiento neural de la información puramente discriminativa. Para poder evaluar el impacto hedónico que un estímulo gustativo causa en un sujeto, se han desarrollado distintos instrumentos y procedimientos comportamentales basados en el registro del consumo relativo de un determinado fluido o en el análisis de las respuestas de reactividad al sabor como ocurre en el “Test de Reactividad Gustativa” elaborado por Grill y Norgren (1978). Este test ha sido utilizado para determinar las reacciones afectivas o hedónicas de un sujeto ante estímulos gustativos (Grill y Norgren, 1978). Estos autores comprobaron que las ratas intactas mostraban unos patrones de respuestas faciales estereotipadas ante la infusión intraoral de estímulos gustativos. Dichas reacciones se podían categorizar como hedónicas positivas (apetitivas) o aversivas (rechazo). Se ha comprobado que estos patrones de respuestas se mantienen en humanos y en otras especies animales (monos) (Grill y Norgren, 1978; Steiner et al., 2001). Por ejemplo, en niños el sabor a sacarosa origina expresiones faciales afectivas apetitivas, como protusión de la lengua, sonrisa..., mientras que el sabor de la quinina, provoca respuestas de

disgusto (por ejemplo, abrir la boca y fruncir el ceño, llanto, sacudidas de la cabeza, arrugar la nariz...) (Steiner et al., 2001).

En general, se han descrito preferencias innatas en diferentes especies animales hacia los sabores dulces y salados, así como una tendencia a rechazar los sabores ácidos o amargos incluso en condiciones de privación de alimento, aunque éstas pueden verse modificadas por el aprendizaje (Le Magnen, 1992; 1999; Drewnowski, 1997; Steiner et al., 2001; Saper et al., 2002). Este hecho tiene un considerable valor adaptativo puesto que con frecuencia los sabores ácidos o amargos van asociados a sustancias tóxicas o en mal estado, y los sabores dulces y salados indican los nutrientes que son fundamentales para la supervivencia.

Sin embargo, la importancia de las características orosensoriales en el consumo de alimentos se ha puesto de manifiesto sobre todo con los “estudios de cafetería”. Estas investigaciones han demostrado un aumento significativo en la ingesta de dietas con una amplia variedad de sabores apetitosos (dieta de cafetería), frente a la ingesta de dietas no variadas (Novin, 1988; Martín et al., 1991; Rolls, 1997). Este aumento en la ingesta que producen las dietas de cafetería, puede deberse a que la saciedad está en cierta medida relacionada con el sabor (“saciedad sensorialmente específica”).

Cuando se produce “saciedad sensorialmente específica” se observa un descenso en la actividad neuronal de la Corteza Orbitofrontal (Rolls, 1996). Rolls considera que esta parte del córtex estaría implicada en el establecimiento de las asociaciones estímulo-refuerzo y actuaría como una “función ejecutiva” en el control de la conducta desencadenada en función del refuerzo o castigo (Rolls, 1996). Las señales del Córtex Prefrontal serían procesadas a través del Estriado y el Núcleo Accumbens. Este último sería una vez más la interfaz entre las señales sensoriales procedentes del Córtex, la Amígdala y el Hipocampo, y la respuesta motora conductual (Robbins y Everitt, 1996; Rolls, 1996; Hoebel, 1997; Kalivas y Nakamura, 1999).

Con respecto al mecanismo neuroquímico que subyace a la hiperfagia propia de una dieta variada y apetecible, con elevada “palatabilidad” (Le Magnen, 1992; Hetherington, 1996; Swithers, 1996; Rolls, 1997), un buen número de investigaciones implican al sistema de opiáceos endógeno. En efecto, se ha comprobado que la administración de antagonistas opiáceos (naltrexona), reduce el incremento en la ingesta sin afectar a la ingesta de comida

normal (Cooper y Higgs, 1994; Le Magnen, 1992; Bodnar, 2004). En seres humanos la administración de naltrexona, no solo afecta a la cantidad de comida ingerida sino que también provoca un descenso de la duración de las comidas, así como en el grado de preferencia de los sujetos por alimentos apetitosos (Yeomans y Gray, 1997).

Resultados similares se han obtenido en animales. La administración de naloxona bloquea las preferencias gustativas que las ratas muestran por estímulos dulces como una solución de sacarina o de glucosa y reduce el consumo de dietas con alto contenido en grasas (Le Magnen et al., 1980; Lynch, 1986; Le Magnen, 1990; Berridge, 1996; Yu et al., 1999; Yeomans y Gray, 2002). Por el contrario, la administración de agonistas opiáceos como la morfina, o agonistas selectivos de receptores  $\mu$  (DAMGO, beta-endorfinas, sustancias análogas a las encefalinas como RX 783030), incrementa la cantidad de comida ingerida en condiciones de ingesta espontánea y la preferencia por soluciones con sacarina (Sanger y McCarthy, 1981; Le Magnen, 1992; para una revisión ver Bodnar, 2004).

Estos resultados han intentado determinar también si la administración de opiáceos favorece la ingesta de nutrientes concretos o si, por el contrario tiene una acción indiferenciada en este sentido, favoreciendo la ingesta de sustancias previamente preferidas por el sujeto. Los resultados obtenidos son controvertidos: Por una parte, existe evidencia de que los opiáceos podrían actuar favoreciendo la ingesta de nutrientes en función de las preferencias gustativas previas de cada sujeto (Evans y Vacarino, 1990; Gosnell et al., 1990; Drewnowski et al., 1992; Doyle et al., 1993; Koch y Bodnar, 1994; Levine y Billington, 1997; Yeomans y Gray, 1997; 2002; Zhang y Kelley, 1997; Giraud et al., 1999); mientras que otras investigaciones muestran una actuación específica de estas sustancias opiáceas sobre la ingesta de grasas (Marks-Kaufman y Kanarek, 1990; Levine y Billington, 1997).

Ambas hipótesis podrían no ser contradictorias si se considera el estado de privación del organismo. En este sentido Zhang y colaboradores han demostrado que en condiciones normales, la administración de agonistas opiáceos provoca un aumento selectivo en la ingesta de grasas, mientras que bajo un estado de privación, los opiáceos estimulan la ingesta de alimentos en función de sus preferencias previas (Bodnar, 1996; Zhang et al., 1998).

Otras investigaciones han corroborado la interrelación existente entre el sistema de opiáceos y la conducta nutritiva (Cooper y Higgs, 1994; Bodnar, 1996; Carr, 1996; Gosnell

y Levine, 1996; Vaccarino, 1996; Drewnowski, 1997). Estudios llevados a cabo con seres humanos y animales apuntan que los opiáceos podrían actuar modificando el valor hedónico del estímulo gustativo empleado, produciendo así un aumento en la ingesta (Le Magnen et al., 1980; Berridge, 1996; Carr, 1996; Yeomans y Grey, 1997; 2002; Le Magnen, 1990; Li et al., 2003). Por ejemplo, mediante el “Test de Reactividad Gustativa” se ha comprobado que la administración de morfina directamente en el NAcc (capsular) provoca reacciones faciales afectivas similares a las observadas ante la sacarosa (Doyle et al., 1993; Peciña y Berridge, 2000). Asimismo en un estudio llevado a cabo en roedores intactos, se ha comprobado que la reducción en la ingesta de una solución de sucrosa al 20% tras la administración de antagonistas opiáceos  $\mu$  y  $\kappa$ , es similar al descenso observado en la ingesta de esta solución, cuando se reduce la concentración de sacarosa del 20 al 10% (Bodnar, 1996).

Por otra parte, la ingesta de sustancias apetitosas (particularmente dulces) como azúcar, chocolate, etc., puede llegar a provocar un estado analgésico similar al observado cuando se administran opiáceos o al observado durante un estado de estrés, así como un efecto de tolerancia cuando se emplean de forma conjunta con fármacos opiáceos o sustancias análogas (Kanarek et al., 1997; 2000; D’Anci et al., 1997; Mercer y Holder, 1997). En ratas, la ingesta crónica de sacarosa también produce un estado de analgesia similar al obtenido con morfina (D’Anci et al., 1997; Kanarek et al., 2000). Asimismo, la exposición repetida al chocolate provoca un descenso en la expresión de preproencefalinas (PPE) en el NAcc (nuclear y capsular), y en el Estriado Dorsal y Lateral (Kelley et al., 2003). Kelley y colaboradores sugieren que este resultado ocurre como un mecanismo de compensación en respuesta a la repetida exposición a los opiáceos liberados por la ingesta de chocolate. Según estos autores, este efecto sería similar al observado cuando se produce una exposición crónica a la morfina, que desencadena un descenso en la expresión del ARNm de las PPE en los Núcleos Caudado y Accumbens. Igualmente se ha observado que sujetos adictos a opiáceos o alcohol muestran un aumento en el consumo así como un intenso deseo por los alimentos dulces cuando se encuentran bajo un estado de abstinencia. Este hecho ha sido interpretado por algunos autores como un intento de suplir los efectos de dichas sustancias, al menos parcialmente, con los opiáceos que se liberan por el consumo de dulces (Mercer y Holder, 1997; Pelchat, 2002).

Más aún, la ingesta de comidas apetitosas ha sido asociada con la liberación de opiáceos endógenos como las  $\beta$ -endorfinas, en el fluido cerebroespinal y en el Hipotálamo

(Dum et al., 1983; Yeomans y Gray, 2002), una estructura ésta que ha sido relacionada con la ingesta y la recompensa inducida por la Autoestimulación Intracerebral.

Por otra parte, distintos estudios han demostrado la existencia de numerosos receptores opiáceos  $\mu$  y  $\kappa$ , en estructuras cerebrales relacionadas con la ingesta (Gosnell et al., 1986; Lynch, 1986; Carr et al., 1991; Gosnell y Levine, 1996; Giraudo et al., 1998 a; b) y cómo éstos pueden verse afectados por la privación de alimentos (Berman et al. 1994; Carr y Papadouka, 1994; Koch y Bodnar, 1994; Wolinsky et al., 1994; 1996; Bodnar et al., 1995; Bodnar, 1996; Leventhal y Bodnar, 1996; Stewart et al., 1996; Ragnauth et al., 1997).

En este mismo sentido, algunos autores han propuesto que, al igual que los opiáceos, la actuación de la dopamina sobre los receptores  $D_1$  localizados en el NAcc, provocaría un aumento en la valoración hedónica de la comida, lo que a su vez facilitaría la ingesta de aquellos nutrientes que son preferidos por el sujeto (Cooper et al., 1992). Además existe una manifiesta interacción entre el sistema de opiáceos y el sistema dopaminérgico mesolímbico. La actividad opiácea podría actuar modulando la actividad de los receptores  $D_1$  y  $D_2$  de la vía mesocorticolímbica, a través de la unión a receptores opiáceos del Área Tegmental Ventral y del Núcleo Accumbens (Gosnell et al., 1986; Evans y Vacarino, 1990; Carr y Papadouka, 1994; Hobbs et al., 1994; Schaeffer et al., 1994; Moufid-Bellancourt et al., 1996; Nencini, 1996; Zang y Kelley, 1997; Carr y Kutchukhidze, 2000).

Otras sustancias relacionadas con el aumento en la valoración hedónica de los estímulos gustativos son las Benzodiazepinas (Cooper y Higgs, 1996). Distintos autores sugieren que estas sustancias actúan directamente sobre los procesos relacionados con la “palatabilidad” facilitando una valoración hedónica positiva (Treit y Berridge, 1990). Como consecuencia, se incrementan los patrones de ingesta y los factores incentivos que provoca una conducta de aproximación hacia la comida (Cooper y Higgs, 1994; 1996; Berridge y Peciña, 1995; Berridge y Robinson, 1998). Utilizando tests de preferencia por un sabor, se ha demostrado que la administración de benzodiazepinas aumenta las preferencias por los sabores dulces, salados así como por soluciones calóricas como la sacarosa o las emulsiones lipídicas (Cooper y Higgs, 1994; 1996). Asimismo, estudios realizados con el Test de Reactividad Gustativa, muestran que las benzodiazepinas potencian las reacciones afectivas ante la ingesta de sustancias apetitivas, no viéndose afectadas las respuestas aversivas (Treit y Berridge, 1990). Aunque posteriormente, se ha comprobado que la

administración de estas sustancias inhibe el efecto aversivo (sabor amargo) que provocan sustancias como la quinina (Cooper y Higgs, 1994; 1996).

Dado que tanto las benzodiazepinas como los opiáceos actúan modulando la “palatabilidad” de los estímulos gustativos, se ha examinado si existe una interacción entre ambos sistemas (Stapleton et al., 1979; Birk y Noble, 1981; Britton et al., 1981; Berridge y Peciña, 1995; Cooper y Higgs, 1996; Basso y Kelley, 1999). En efecto, se ha comprobado que la administración de antagonistas opiáceos (naloxona) bloquean la hiperfagia inducida por las benzodiazepinas (Stapleton et al., 1979; Birk y Noble, 1981; Britton et al., 1981). Una de las regiones anatómicas donde podría producirse esta interacción es en el Complejo Parabraquial, ya que posee células que procesan las propiedades sensoriales y las cualidades hedónicas de los estímulos gustativos (Yamamoto et al., 1994; 1998), dispone de receptores para ambos sistemas de neurotransmisión (Mansour et al., 1988; Higgs et al., 1993) y está considerado como una estructura clave en el control de la ingesta (Fulwiler y Saper, 1984; Nagai et al., 1987; Takaki et al., 1990; Krukoff et al., 1993; 1994; Moufid-Bellancourt y Velley, 1994).

En cualquier caso, las propiedades reforzantes de los alimentos no son constantes sino que dependen de variables como la experiencia previa del sujeto o su estado interno (Berridge, 1991; Hyde y Witherly, 1993; Berridge, 1996, 2000; Hetherington, 1996; Swithers, 1996; Nader et al., 1997). Existe un **interrelación** entre la **características hedónicas** de los alimentos y las **necesidades internas** del organismo (Cabanac, 1971; Van Itallie y Kissileff, 1983; Le Magnen, 1992; 1999). Cualquier cambio en el medio interno o el aprendizaje del sujeto pueden modular las propiedades reforzantes de un alimento, haciendo que éste sea más o menos atractivo (Berridge, 1991; Hyde y Witherly, 1993; Berridge, 1996; 2000; Hetherington, 1996; Swithers, 1996; Nader et al., 1997). Cuanto mayor sea el estado de privación general o de un determinado macronutriente particular, más apetitosos resultaran los alimentos presentados y mayor será la cantidad ingerida (Cabanac, 1971; Le Magnen, 1992; Rigaud et al., 1994; Davis, 1999). En otras palabras, el valor hedónico de un estímulo gustativo puede venir determinado por las características orosensoriales propiamente dichas, pero también por el resultado de un aprendizaje en el que asocie dicho sabor a los beneficios metabólicos que proporciona su ingesta (restablecimiento del equilibrio interno) (Le Magnen, 1990; Carr, 1996; 2002; Nencini, 1996; Saper et al., 2002).



En relación con este fenómeno Cabanac introdujo el concepto de “**aliestesia**” según el cual la percepción afectiva de un estímulo puede cambiar como consecuencia de las fluctuaciones en el estado fisiológico interno del sujeto (Cabanac, 1971; Bernardis y Bellinger, 1998; Epstein et al., 2003). Este autor consiguió una reducción en el valor hedónico de estímulos gustativos mediante cambios en el estado interno, inyectando glucosa directamente en el estómago (Cabanac, 1971; Rolls, 1997). Resultados similares han sido obtenidos por Grill y Norgren mediante el empleo del “Test de reactividad gustativa”. En este estudio, se demostró que mientras que las ratas intactas mostraban reacciones faciales afectivas características de un estímulo hedónicamente positivo ante la sacarosa, cuando ésta fue asociada al cloruro de litio, cambiaban su respuesta, mostrando conductas propias de rechazo o aversión (Grill y Norgren, 1978). Asimismo Berridge (1991) ha demostrado que tanto la privación como la saciedad (en general o saciedad sensorialmente específica) modula la dimensión afectiva del sabor (o palatabilidad) tanto en la valoración hedónica como en la aversiva.

En la misma línea Rolls y colaboradores, han comprobado un aumento en la actividad celular de regiones cerebrales como el Córtex Orbitofrontal Caudolateral o el Hipotálamo Lateral ante la presencia de nutrientes. Estos estudios han puesto de manifiesto que estas células sólo modifican su respuesta ante la presencia de alimentos si el animal está privado, no activándose cuando el animal se encuentra saciado en general o con respecto al mismo alimento administrado repetidamente (Rolls et al., 1976; Rolls et al., 1979; Rolls, 1973; 1997). Estas neuronas que se activan ante la comida cuando el animal está privado coinciden anatómicamente con las activadas mediante la AEIC en las mismas áreas (Rolls et al., 1980; Rolls, 1999).

Por otra parte, la ingesta de alimentos con elevada “palatabilidad” provoca un aumento en la liberación de dopamina en el Córtex Prefrontal (CPF) y en el NAcc capsular. En el NAcc se produce una rápida habituación de este efecto, no observándose así en el CPF. Esta sensibilidad del NAcc a la habituación depende del estado motivacional del sujeto, siendo menor en el caso de estados de privación (Di Chiara y Tanda, 1997). En consecuencia estos autores sugieren que la activación dopaminérgica mesolímbica no codifica la saliencia motivacional de forma genérica, sino que estaría implicada sólo en la codificación de estímulos concretos que por sus características de novedad, aversividad u ocurrencia bajo condiciones de privación, poseen un elevado impacto motivacional para el sujeto (Bassareo y Di Chiara, 1997).

En el caso del *Córtex Orbitofrontal*, su función estaría relacionada probablemente con la saciedad sensorialmente específica (Rolls, 1997; Hinton et al., 2004; O'Doherty, 2004). La *Corteza Insular* por su parte, jugaría un papel fundamental en la "aliestesia" (Small, 2002; Hinton et al., 2004). Todos estos planteamientos se han visto apoyados por distintas investigaciones que se han valido de las técnicas de neuroimagen (tomografía por emisión de positrones, PET) y han demostrado que durante el estado de hambre, se produce una activación de las estructuras que ya habían sido relacionadas con la regulación de la ingesta, como el *Hipotálamo*, la *Amígdala*, el *Área del Cíngulo Anterior* o la *Corteza Insular*, entre otras. Por el contrario, cuando el estado interno del organismo pasa de hambre a saciedad, se observan cambios significativos en *Áreas Corticales Temporales* y el *Córtex Orbitofrontal Lateral* (Hinton et al., 2004). Por otra parte, mediante estudios neurofisiológicos, Yamamoto y su grupo, han demostrado la existencia de las células gustativas "secundarias" o hedónicas que se localizan en la periferia de la *Corteza Insular Granular Anterior*, que se caracterizan por un patrón de respuesta que puede modificarse tras la adquisición de aversiones gustativas en sujetos entrenados en un paradigma de aprendizaje aversivo gustativo. Es decir, estas células que presentan una respuesta que, podemos decir, de preferencia innata por un determinado sabor (sacarina), tras la adquisición de una aversión (mediante un procedimiento de aprendizaje aversivo gustativo), cambian su patrón de respuesta, mostrando una respuesta propia de rechazo (como la respuesta ante la quinina) (Yamamoto et al., 1989). Un efecto similar se ha observado en otras áreas gustativas localizadas a niveles inferiores troncoencefálicos y concretamente en el *NTS* y el *Complejo Parabraquial*, aunque también en áreas hipotalámicas (Schwartzbaun, 1983; Di Lorenzo y Hecht, 1993).

En resumen, parece claro que la privación de alimento afecta al incentivo o al valor reforzante de los alimentos, sin modificar la valoración hedónica que los sujetos hacen de los estímulos gustativos empleados (Epstein et al., 2003). Así pues la motivación para la ingesta y el impacto hedónico de la comida (o palatabilidad), parecen ser procesos diferentes, con sustratos neurales independientes (Berridge, 1996; Epstein et al., 2003). Peciña y Berridge (2000) sugieren que la ingesta de comida inducida por los opiáceos, es consecuencia de un aumento en el placer originado por la comida y por consiguiente, se podría decir que el sistema de opiáceos media la "palatabilidad" de los alimentos. Por su parte Robinson y Berridge (2000) proponen que el sistema de dopamina y en particular el sistema meso-Accumbens, sería el responsable de los cambios en la capacidad reforzante de los alimentos. En efecto, investigaciones con técnicas de microdiálisis muestran un aumento

en la liberación de DA en el NAcc ante la presentación de un sabor que previamente a sido asociado a beneficios metabólicos producidos por la inyección intragástrica una sustancia nutritiva (Policose), no observándose este aumento en la liberación de DA cuando el estímulo gustativo presentado es asociado con un estímulo neutro (agua) (Mark et al., 1994). Existen opiniones distintas y así, otras investigaciones muestran que la dopamina no es necesaria para la respuesta hedónica que se produce hacia los estímulos gustativos dulces, ni para su discriminación, puesto que en su ausencia (ratones manipulados genéticamente que carecen de dopamina) el aprendizaje para el consumo preferencial de sustancias dulces no queda afectado (Cannon y Palmiter, 2003; Cannon y Bseikri, 2004).

### **2.1.2. APRENDIZAJE INTEROCEPTIVO O AVERSIVO GUSTATIVO.**

Como se acaba de mencionar anteriormente, existe evidencia de que los mecanismos cerebrales de la recompensa están interrelacionados de alguna manera, con los sistemas aversivos, ya que un estímulo gustativo inicialmente apetitivo, puede transformarse, a través del aprendizaje, en aversivo y por tanto, rechazado para su consumo (Yamamoto et al., 1989; Sowards, 2004). Algunos autores consideran que durante el aprendizaje aversivo gustativo se produce un cambio en la valoración hedónica del estímulo gustativo. En este sentido, se ha comprobado una reducción en la ingesta y un aumento en las respuestas afectivas de rechazo al sabor (Test de Reactividad Gustativa) en pruebas de aprendizaje aversivo (Parker y Carvell, 1986; Parker, 1991). Y, al igual que sucedía en el caso de la inducción de preferencias gustativas, este aprendizaje provoca cambios en la actividad del sistema opiáceo endógeno, cambios que también han sido relacionados con reacciones al dolor, malestar, agresión y estimulación aversiva (Le Magnen, 1992).

El análisis de los mecanismos cerebrales implicados en el procesamiento aversivo, sobre todo de origen visceral, se ha llevado a cabo, en parte, a través del denominado aprendizaje aversivo gustativo o toxifobia, descrito por primera vez por J. García y colaboradores en los años 50. Este fenómeno también denominado aprendizaje interoceptivo, consiste en la tendencia a rechazar cualquier sustancia cuya ingesta haya sido asociada previamente con un estímulo nocivo que genere malestar, generalmente de origen visceral (Gallo y Puerto, 1986; Gallo et al., 1991; Yamamoto y Fujimoto, 1991; Spector et al., 1992; Yamamoto et al., 1992; Agüero et al. 1993a; b; Gu et al., 1993; Reilly et al., 1993; Yamamoto, 1993; Sakai y Yamamoto, 1997; 1998). La asociación que se produce

entre ambos estímulos es tan sólida y duradera, que basta un sólo ensayo para que los animales eviten el consumo de dicha sustancia, incluso aunque sea necesaria para su supervivencia. Este proceso adquisitivo resulta de enorme valor adaptativo, ya que evita que los sujetos ingieran sustancias que podrían resultarles fatales (Puerto y Molina, 1980; Molina y Puerto, 1981).

En el ámbito experimental este tipo de aprendizaje se ha establecido mediante la asociación de estímulos gustativos con un tratamiento que induce náuseas o malestar gastrointestinal como por ejemplo, el cloruro de litio, la escopolamina, la rotación corporal o la irradiación (Gallo y Puerto, 1986; Gallo et al., 1991; Yamamoto y Fujimoto, 1991; Spector et al., 1992; Yamamoto et al., 1992; Agüero et al. 1993a; b; Gu et al., 1993; Reilly et al., 1993; Yamamoto, 1993; Sakai y Yamamoto, 1997; 1998). Aunque también se ha comprobado que incluso algunas sustancias de abuso con un marcado efecto reforzante, como la morfina, nicotina, etanol, cocaína, anfetaminas..., pueden asimismo actuar como estímulos aversivos (Puerto y Molina, 1980; Molina y Puerto, 1981; Gamzu et al., 1985; Parker y Carvell, 1986; Parker, 1991; Bechara et al., 1993; Sakai y Yamamoto, 1997; Bures et al., 1998; Welzl et al., 2001).

### **2.1.2.1. CARACTERÍSTICAS DEL APRENDIZAJE AVERSIVO GUSTATIVO (AAG).**

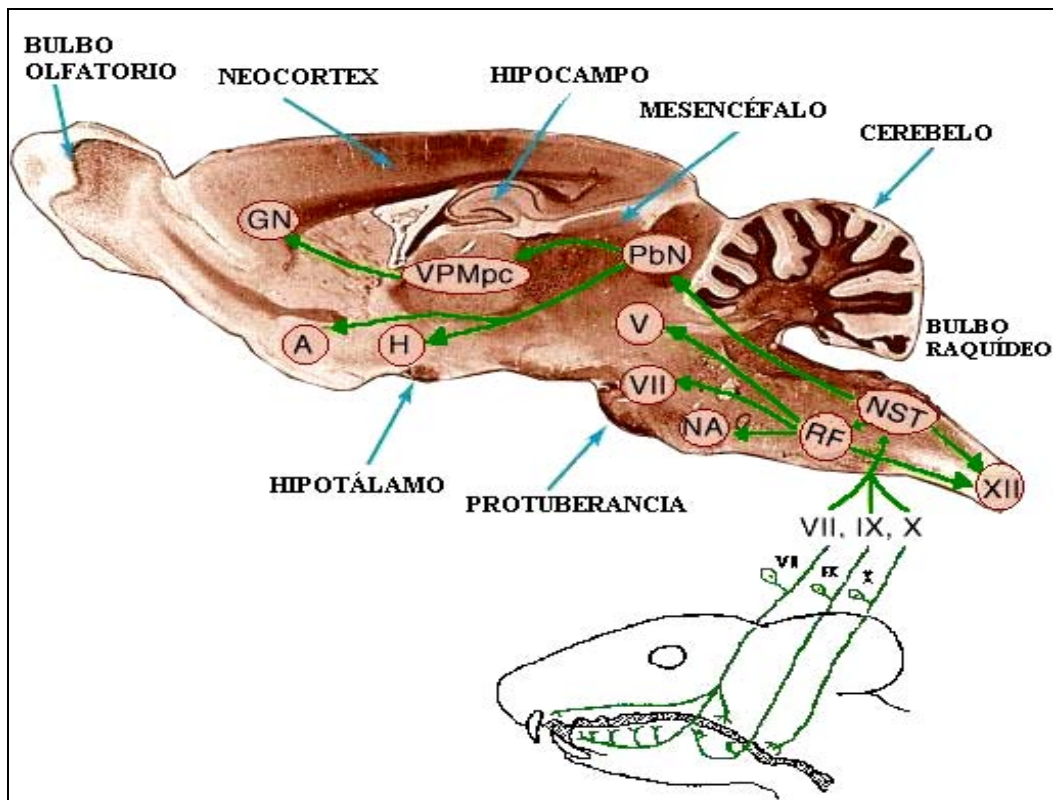
Este tipo de aprendizaje presenta diversas características que hacen que difiera de los modelos tradicionales de aprendizaje asociativo y por ello es considerado por la mayoría de los autores como un “aprendizaje especial” (Domjan, 1985; Bures et al., 1998; Welzl et al., 2001). Más aún, teóricamente se ha diferenciado entre el aprendizaje aversivo gustativo concurrente, de carácter implícito, y el AAG secuencial con características propias de los aprendizajes explícitos, relacionales (Mediavilla et al., 2001; 2005). Con respecto a esta última modalidad hay que destacar la *rapidez de adquisición y resistencia a la extinción*. Y así, un único ensayo de asociación entre el estímulo gustativo y el estímulo aversivo, es suficiente para establecer el aprendizaje tanto en condiciones naturales como en el laboratorio (García, 1990), perdurando dicho aprendizaje casi de forma indefinida (Puerto y Molina, 1980). Por otra parte, y a diferencia de los modelos tradicionales de aprendizaje, la mayoría de los organismos están predispuestos para asociar preferentemente determinados estímulos; en los mamíferos, por ejemplo, los estímulos gustativos son

asociados fácilmente a las consecuencias viscerales negativas de índole gastrointestinal, mejor que a cualquier otra modalidad sensorial (*especificidad sensorial*) (Bures et al., 1998; Welzl et al., 2001), especialmente cuando los estímulos son novedosos (Dogteron y Van Hoff, 1988; Bures et al., 1998; Welzl et al., 2001). Además, este tipo de aprendizaje relacional puede establecerse de forma efectiva sin que se requiera contigüidad temporal entre los estímulos, permitiendo la existencia de amplios intervalos de tiempo (incluso horas) entre el estímulo gustativo y el visceral (*demora interestimular*).

La peculiaridad del AAG es que reúne todas estas condiciones de forma simultánea permitiendo encuadrarlo dentro de los aprendizajes relacionales /explícitos biológicamente especializados (Molina y Puerto, 1981; Mediavilla et al., 2001; 2005).

### **2.1.2.2. BASES NEURO-ANATÓMICAS DEL APRENDIZAJE AVERSIVO GUSTATIVO (AAG).**

La necesaria convergencia neuronal de los estímulos (el estímulo gustativo y el malestar visceral (García et al., 1985) y del cambio en la valoración hedónica de los estímulos, ha llevado a intentar identificar el sustrato neuro-anatómico en el que se puede producir tal asociación (Yamamoto et al., 1991; Yamamoto, 1993; Sowards, 2004). La vía anatómica responsable de la **información gustativa** se origina en la cavidad orofaríngea con quimiorreceptores relacionados con la detección sensorial y el valor hedónico de los estímulos nutritivos (Novin et al., 1981), con la selección de alimentos (Norgren, 1983) o con el consumo energético e hidromineral (Norgren, 1984; 1985). Los receptores más próximos al tracto gastrointestinal han sido relacionados con diversos aspectos de la conducta de ingesta en general y con procesos reflejos de defensa, como el vómito (Finger y Morita, 1985). Toda esta información sensorial, es transmitida mediante tres Pares Craneales distintos: Facial, Glossofaríngeo y Vago (Hamilton y Norgren, 1984; Norgren, 1995; Rolls, 1997; Spector, 2000; Sako et al., 2000) (ver Figura 6).



**Figura 6.** Representación esquemática de las vías ascendentes gustativas en la ratona. V, VII y XII, Núcleos Motores Trigeminal, Facial e Hipoglosa; VII, IX y X, axones de las fibras gustativas periféricas de los Nervios Facial, Glossofaríngeo y Craneal Vagal, respectivamente; NST, Núcleo del Tracto Solitario; PbN, Núcleo Parabraquial; VPMpc, región Parvicelular del Núcleo Ventral Posteromedial del Tálamo; GN, Neocórtex Gustativo; H, Hipotálamo; A, Amígdala; NA, Núcleo Ambiguo; RF, Formación Reticular (Adaptado de Yamamoto, 1998; y Smith y Shepher, 2002).

Estos Pares Craneales (VII, IX y X) proyectan directamente hacia la zona rostral del Núcleo del Tracto Solitario (NTSr), que constituye el primer relevo gustativo a nivel central. Esta estructura se localiza en la región dorsomedial del Bulbo y es un centro importante para la información relacionada, entre otras, con el tracto digestivo (Norgren y Leonard, 1971; Norgren y Pfaffmann, 1975; Beckstead y Norgren, 1979; Contreras et al., 1982; Shapiro y Miselis, 1985b; Powley et al., 1992; Andresen y Mendelowitz, 1996).

La información gustativa procedente del NTS rostral (NTSr) tiene su siguiente relevo anatómico en el Núcleo Parabraquial (NPB), también llamado área gustativa pontina (Norgren y Leonard, 1971; Fulwiler y Saper, 1984; Norgren, 1990). Concretamente, las

fibras gustativas proyectan principalmente en el Núcleo Parabraquial Medial, en el Área del “Waist” y en los subnúcleos de la división Lateral: el Lateral Central, el Lateral Ventral y la parte interna del subnúcleo Lateral Externo (Herbert et al., 1990; Nishijo y Norgren, 1990, 1997; Whitehead, 1990; Halsell et al., 1996; Harrer y Travers, 1996; Halsell y Travers, 1997; Kobashi y Bradley, 1998; Sowards, 2004). A partir de aquí la información se dirige hacia áreas más rostrales siguiendo dos trayectorias (Norgren y Leonard, 1971; Kiefer, 1985; Norgren, 1990; Bures et al., 1998; Reilly, 1999; Welzl et al., 2001): una vía talámico-cortical (Fulwiler y Saper, 1984; Dunn y Everitt, 1988; Norgren, 1990; Bures et al., 1998; Welzl et al., 2001) y otra ventral (Fulwiler y Saper, 1984; Halsell, 1992; Bures et al., 1998; Welzl et al., 2001).

La **vía talámico-cortical** proporciona el sustrato de la sensibilidad gustativa a nivel talámico y cortical. Se dirige bilateralmente hacia la región Parvocelular del Núcleo Ventral Posteromedial del Tálamo (VPMpc) o Núcleo Talámico Gustativo (Norgren y Leonard, 1971; Norgren y Pfaffmann, 1975; Cechetto y Saper, 1987; Norgren, 1995; Price, 1995; Lenz et al., 1997; Nakashima et al., 2000). Estas dos estructuras, el Tálamo y el NPB, envían proyecciones directas a la Corteza Cerebral (Norgren y Pfaffmann, 1975; Fulwiler y Saper, 1984; Dunn y Everitt, 1988; Norgren, 1990), específicamente a la Corteza Insular Disgranular y a la parte facial de la Corteza Somatosensorial (Yamamoto et al., 1980; Cechetto y Saper, 1987; Norgren, 1985, 1995; Ogawa et al., 1992; Hanamori et al., 1997; Reilly, 1998; Nakashima et al., 2000).

Las proyecciones directas que van desde el Complejo Parabraquial a la Corteza Gustativa (Saper y Loewy, 1980; Fulwiler y Saper, 1984; Norgren, 1985, 1995; Price, 1995; Saper, 1995a), proceden de la subdivisión Medial, del Área Waist y de los subnúcleos Ventral Lateral y Medial Externo (Fulwiler y Saper, 1984; Di Lorenzo y Monroe, 1992; Saper, 1995a).

La **vía ventral** se distribuye por distintas estructuras prosencefálicas y diencefálicas relacionadas con la ingesta de agua y comida, así como con aspectos afectivos y mnemónicos del gusto. Las proyecciones más intensas se dirigen hacia la división medial del Núcleo Central de la Amígdala (CeM), al Núcleo Lecho de la Estría Terminal (NLET), a la Sustancia Innominada (SI) y al Hipotálamo Lateral (HL) (zonas que también recibe proyecciones desde el NTS) (Norgren y Leonard, 1971; Fulwiler y Saper, 1984; Kiefer,

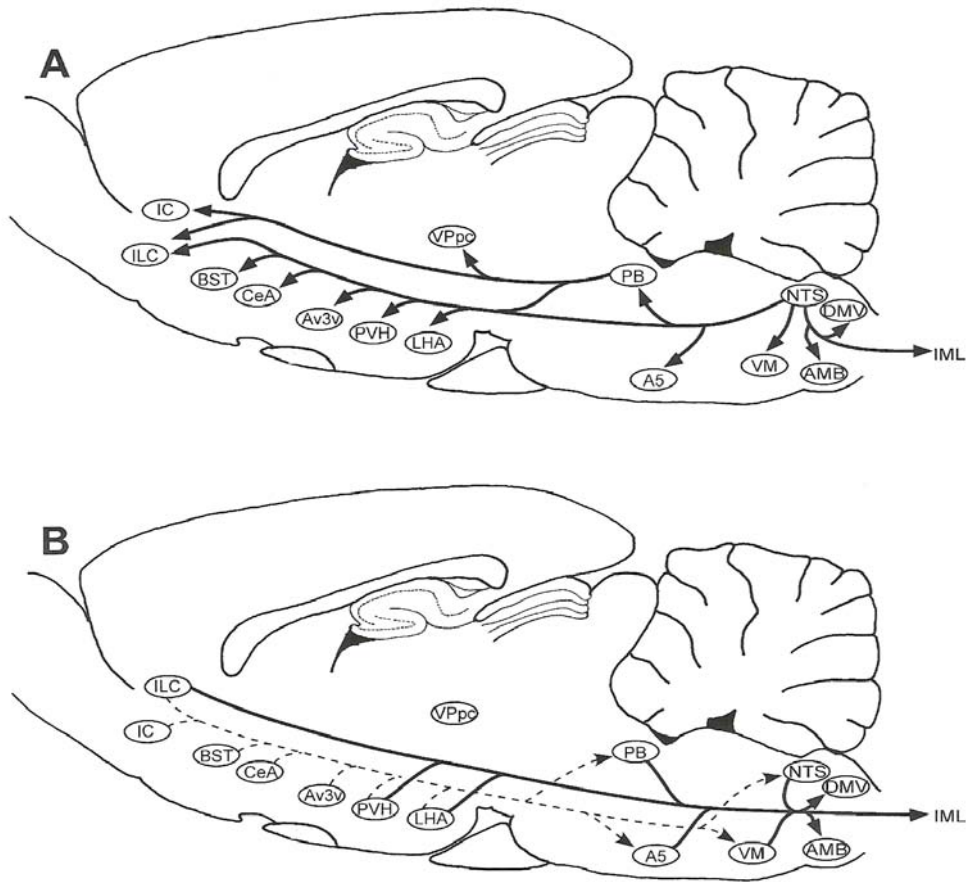
1985; Dunn y Everitt, 1988; Norgren, 1990; Halsell, 1992; Reilly y Pritchard, 1996a; b; Schul et al., 1996; Rolls, 1997; Spector, 2000).

En primates se observan algunas diferencias anatómicas en la transmisión de la información gustativa, comprobándose que ésta se dirige directamente al Tálamo y se incorpora a la ruta ventral mediante conexiones descendentes desde las Cortezas Gustativas Primaria y Asociativa (Rolls, 1997; Spector, 2000).

Con respecto a la **información** de origen **visceral**, se han propuesto dos **sistemas de detección y transmisión** de los estímulos viscerales hacia el SNC (ver Figura 7), uno constituido por mecanismos **neurales** y otro mediante estructuras **humorales**. En efecto, el sistema nervioso periférico parece desempeñar funciones de sistema sensorial interoceptivo de carácter rápido. En este sentido, existe considerable evidencia de que la información visceral procedente de los distintos receptores localizados a lo largo del tracto digestivo puede ser detectada y transmitida mediante los nervios Espláncnicos (Mei, 1983) pero sobre todo por el Sistema Parasimpático y el Nervio Vago (Simansky et al., 1982; Jerome y Smith, 1984; Sakaguchi y Yamazaki, 1986), el cual establece conexiones centrales en los dos tercios caudales del NTS (Nauta y Feirtag, 1987; Rogers et al., 1995; Paton et al., 2000; Ruggiero et al., 2000), pero también en el Núcleo Dorsomotor del Vago, en el Núcleo Cuneatus Externo, en el Área Postrema, en el Núcleo Ambiguo y en el subnúcleo principal de la Oliva Inferior (Kalia y Mesulan, 1980; Fitzakerley y Lucier, 1988; Yamamoto et al., 1992; Kobashi et al., 1993; Gieroba y Blessing, 1994; Knox et al., 1994; Yousfi-Malki y Puizillout, 1994).

A partir del NTS caudal surgen un gran número de proyecciones hacia estructuras cerebrales localizadas a distintos niveles de organización dentro del SNC (Sawchenko, 1983; Leslie et al., 1992; Zhang et al., 1992; Heimer, 1995), entre ellas al Núcleo Dorsomotor del Vago (Sawchenko, 1983; Loewy, 1990b; Leslie et al., 1992), el Núcleo Ambiguo (Sawchenko, 1983; Leslie et al., 1992) y el NPB (Loewy y Burton, 1978), principalmente en la división lateral (Fulwiler y Saper, 1984; Herbert et al., 1990). Y aunque, distintos estudios han demostrado la existencia de información visceral vagal tanto en las divisiones medial como lateral del Complejo Parabraquial (Roger et al., 1979; Hermann y Rogers, 1985; Bernard et al., 1994), hay que destacar sobre todos al subnúcleo Externo del NPB Lateral (Yamamoto et al., 1992; 1993; Gu et al., 1993; Hochstenbach et al., 1993; Kobashi et al., 1993; Bernard et al., 1994; Gieroba y Blessing, 1994).





**Figura 7.** Sistemas de aferencias (A) y eferencias (B) viscerales del sistema nervioso autónomo. En la Figura A, se identifican los grupos celulares que reciben aferencias directas desde el Núcleo del Tracto Solitario (NTS) o a través de un relevo en el Núcleo Parabraquial (PB). Como puede comprobarse, se pueden identificar dos vías de proyecciones ascendentes. Las proyecciones hacia el Núcleo Ventroposterior Parvocelular del Tálamo (VPpc) y la Corteza Insular, que se originan exclusivamente en el Núcleo Parabraquial de la ratona, y aquellas que inervan el Hipotálamo [incluyendo la región ventral-anterior del tercer ventrículo (Av3v), el Núcleo Paraventricular (Pa) y el área hipotalámica lateral (LH)], el Corteza Infralímbico (ILC), y el prosencéfalo basal [incluyendo el Núcleo Lecho de la Estría Terminal (BST) y el Núcleo Central de la Amígdala (CeA)] que se originan tanto en el Núcleo Parabraquial como en el Núcleo del Tracto Solitario. En la Figura B, aparecen las principales eferencias hacia las neuronas preganglionares del Bulbo Raquídeo y de la Médula Espinal. Las vías directas hacia grupos neuronales preganglionares, están representadas por líneas continuas. Las líneas discontinuas representan las vías que se originan en estructuras cerebrales que proyectan en lugares premotores viscerales, los cuales a su vez inervan los sistemas preganglionares. A5, grupos de células noradrenérgicas A5; AMB, Núcleo Ambiguo; DMV, Núcleo Dorsomotor del Vago; IML, columna celular intermediolateral; VM, Formación Reticular Medular ventral (Saper, 2004).

Posteriormente, la información visceral es transmitida hacia distintos núcleos del Hipotálamo y el sistema límbico como el Núcleo Central de la Amígdala o el NLET (Saper y Loewy, 1980; Fulwiler y Saper, 1984; Herbert et al., 1990; Krukoff et al., 1992; Bernard et al., 1993; Granata, 1993; Alden et al., 1994; Bester et al., 1997; Saper, 2004). Aunque también se ha descrito una proyección extratalámica que envía información masiva a la porción caudal del Córtex Insular Gustativo (Ito, 1992; 1994).

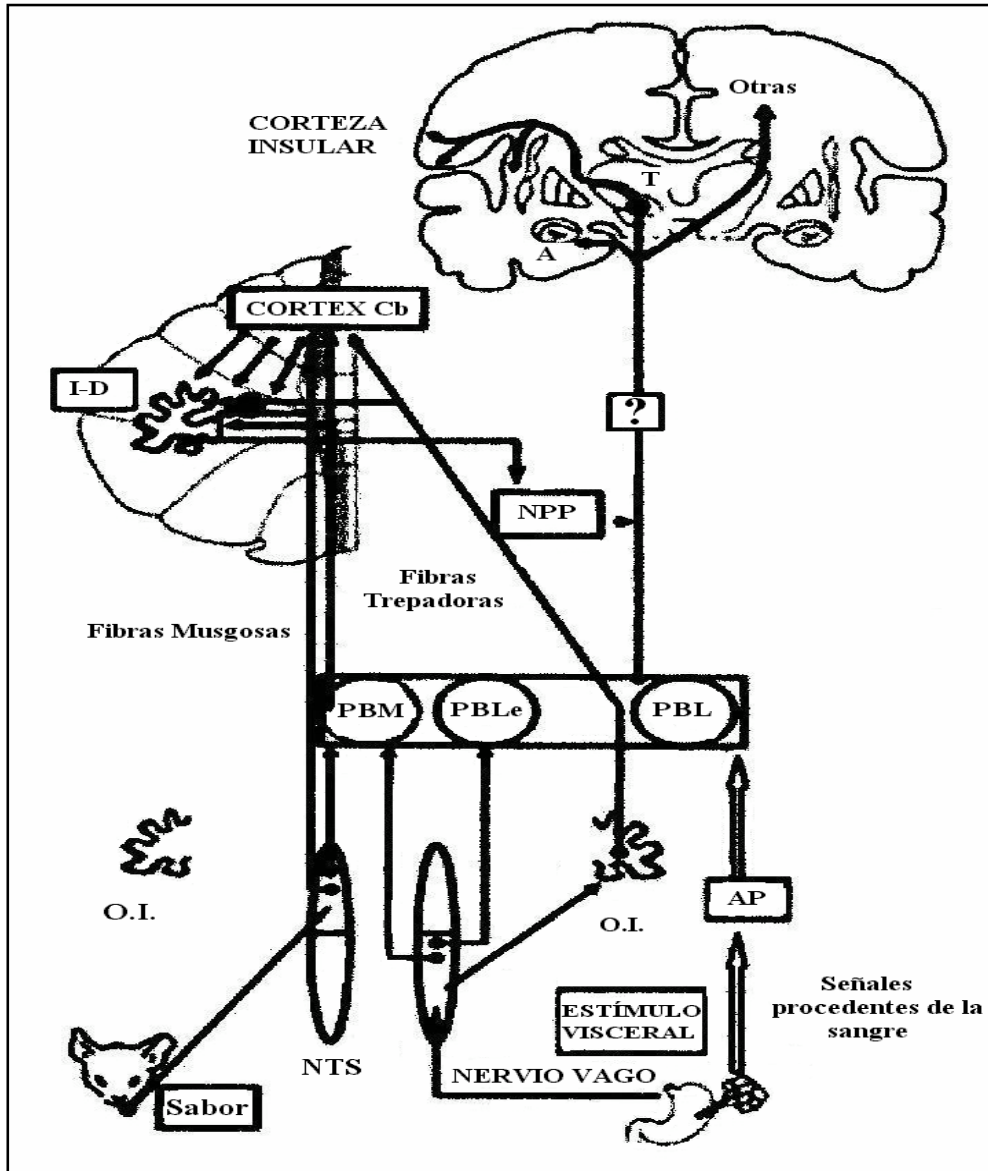
El segundo sistema de transmisión de la información relacionada con los procesos digestivos es de carácter **humoral** (Herbert et al., 1990; Sakai y Yamamoto, 1999). Este sistema participaría en el procesamiento de sustancias tóxicas presentes en el torrente circulatorio y por su propia naturaleza, constituye una vía de transmisión mucho más lenta (Molina y Puerto, 1981). Es bien sabido que la barrera hematoencefálica impide el acceso de numerosas sustancias al medio cerebral (Heimer, 1995). Sin embargo, el cerebro dispone de estructuras especializadas (Órganos Circunventriculares) que permiten detectar la presencia de diversas sustancias en el riego sanguíneo (Johnson y Loewy, 1990). El Área Postrema (AP) es precisamente una de estas estructuras que a su vez transmite la información recibida a otras regiones del SNC (Johnson y Loewy, 1990). Esta estructura ha sido considerada como un centro emético (Adachi y Kobashi, 1985; Shapiro y Miselis, 1985a; Strominger et al., 1994), aunque también se ha relacionado otras funciones como la ingesta de alimento (Edwards y Ritter, 1981; Adachi y Kobashi, 1985; Shapiro y Miselis, 1985a; Adachi et al., 1995; Stricker et al., 1997; Lutz et al., 1998b), la regulación hídrica (Johnson y Loewy, 1990; Rogers et al., 1995) o con diversas funciones de índole vascular (Johnson y Loewy, 1990; Cai et al., 1994; Rogers et al., 1995; Hasser et al., 1997).

El AP también recibe información visceral vagal (Van der Kooy y Koda, 1983; Shapiro y Miselis, 1985a, b; Herbert et al., 1990; Strominger et al., 1994), por lo que algunos autores la han propuesto como una zona potencial donde se puede producir la integración de la información visceral humoral y vagal, así como la transmisión de ésta a estructuras como el NPB (Lança y Van der Kooy, 1985; Suemori et al., 1994). Por otra parte, el AP mantiene conexiones recíprocas con estructuras tales como el NTS, Núcleo Dorsomotor del Vago y el Complejo Parabraquial (Cunningham et al., 1994), y concretamente hacia los subnúcleos Extremo y Externo del NPBI (Van der Kooy y Koda, 1983; Kobashi et al., 1993; Yamamoto et al., 1992; 1993).

A partir de estos datos se pone de manifiesto el paralelismo existente entre las aferencias viscerales y las correspondientes al procesamiento del gusto; así como la coincidencia anatómica de la información sensorial visceral y gustativa (Rogers et al., 1979; Hermann y Roger, 1985; Cechetto, 1987; Di Lorenzo y Monroe, 1992), algo que teóricamente podría ser relevante para dilucidar los mecanismos responsables del aprendizaje asociativo (García et al., 1968; Yamamoto et al., 1993).

En este sentido algunas de las principales estructuras más estudiadas como potenciales centros implicados en el establecimiento de las asociaciones gustativo-viscerales y el cambio hedónico del estímulo gustativo (Chambers, 1990; Kiefer y Orr, 1992; Agüero et al., 1993a, b; Mediavilla, 1995; Mediavilla et al., 2000; Yamamoto, 1993; Bermúdez-Rattoni y Yamamoto, 1998; Swards, 2004) han sido el Complejo Parabraquial (Gallo et al. 1988; 1991; Arnedo et al., 1990; 1991; 1993), la Amígdala (Gaston, 1978; Dunn y Everitt, 1988) y la Corteza Insular, entre otras (Cubero et al, 1999; Kiefer y Orr, 1992; Bures et al., 1998; Sakai y Yamamoto, 1998; Reilly, 1999; Welzl et al., 2001).

En la actualidad, sin embargo, nuestro Grupo de Investigación ha propuesto que podrían existir diversas modalidades adquisitivas en el establecimiento de asociaciones propias del aprendizaje aversivo gustativo (Mediavilla et al., 2001; 2005). En este sentido, se han descrito al menos dos modalidades de aprendizaje diferentes y no redundantes, para la adquisición de aversiones gustativas y cada una de las cuales con circuitos anatómicos particulares: El Aprendizaje Gustativo Concurrente o a Corto Plazo y el Aprendizaje Gustativo Secuencial o a Largo Plazo (Arnedo et al., 1990; 1991; Gallo et al., 1991; Agüero et al., 1993) (ver Figura 8). Estas dos modalidades de aprendizaje difieren en numerosos aspectos a la hora la inducción del aprendizaje correspondiente: Por ejemplo, en el estímulo aversivo requerido, la vía de administración de los estímulos tóxicos, pero sobre todo en las **demandas temporales** de la tarea (Gallo et al., 1988; 1991; Arnedo et al., 1990; 1991; 1993).



**Figura 8.** Modelo anatómico de las vías y núcleos implicados en la transmisión visceral y gustativa relacionada con el aprendizaje aversivo gustativo concurrente y secuencial. Cb, Cerebelo; I-D, Región Interpósita Dentada; NPP, Núcleo Pedúnculo Pontino; PBM, Núcleo Parabraquial Medial; PBL, Núcleo Parabraquial Lateral; AP, Área Postrema; O.I., Oliva Inferior; NTS, Núcleo del Tracto Solitario; A, Amígdala; T, Tálamo. (Adaptado de Mediavilla et al., 2005).

### 2.1.2.3. APRENDIZAJE GUSTATIVO SECUENCIAL O A LARGO PLAZO.

A nivel procedimental, en este tipo de aprendizaje, generalmente se presentan alternativamente (uno cada día) uno de los dos estímulos gustativos, asociando la ingesta de un sabor con la administración de un producto inocuo (por ejemplo, suero fisiológico) mientras que el otro sabor es emparejado con un estímulo visceral aversivo como el cloruro de litio o la estimulación eléctrica del AP entre otros (Gallo et al., 1988; Arnedo et al., 1990; Mediavilla et al., 2000; Zafra et al., 2007). Por su parte, en el aprendizaje gustativo apetitivo (en la inducción de preferencias gustativas) la ingesta de un sabor es asociada con la administración intragástrica de alimento o con estimulación eléctrica intracerebral (Puerto et al., 1976; Cubero y Puerto, 2000; Zafra et al., 2002; 2007). Habitualmente se introduce también una *demora* entre el estímulo gustativo que consume el sujeto y la administración del estímulo aversivo o reforzante asociados a éste (Sakai y Yamamoto, 1998) (ver Figura 9).



**Figura 9.** Procedimiento experimental seguido en la modalidad de Aprendizaje Aversivo Gustativo secuencial o a largo plazo.

En esta modalidad de aprendizaje, han sido implicadas diversas estructuras cerebrales que están relacionadas también con el procesamiento de la información visceral. Así por ejemplo, lesiones del AP impiden el establecimiento del AAG inducido mediante la administración intravisceral de distintas sustancias aversivas como el LiCl o la apomorfina (Ritter et al., 1980; Coil y Norgren, 1981; Agüero, 1990; Bernstein et al., 1992) o el metilnitrato de escopolamina, entre otros (Gallo et al., 1990). El AP proyecta directamente al NPB Lateral (NPBl) (Lança y Van der Kooy, 1985; Yamamoto et al., 1992), y así lesiones de este subnúcleo bloquean el AAG en las mismas condiciones en las que se producía tras lesionar el AP (AAG demorado) (Agüero et al., 1993a).

#### **2.1.2.4. Aprendizaje Gustativo Concurrente o a corto plazo.**

El procedimiento conductual empleado en esta modalidad de aprendizaje consiste en la presentación diaria y al mismo tiempo de dos estímulos gustativos distintos durante unos minutos (7 minutos) de modo que la ingesta de uno de los sabores es asociada a la *administración simultánea* de un producto aversivo (por ejemplo, cloruro de sodio intragástrico) (Deutsch et al., 1976; Arnedo et al., 1993; Mediavilla et al., 2000) o apetitivo (por ejemplo, alimentos predigeridos) (Puerto et al., 1976; Zafra et al., 2002; 2007). Por su parte, el otro sabor suele ser asociado con la inyección intragástrica de un producto inocuo, por ejemplo, suero fisiológico. Para que este aprendizaje pueda producirse se requiere que el sujeto pueda detectar y procesar rápidamente la información de los estímulos gustativo y visceral, sólo así ambos estímulos (el visceral y su correspondiente gustativo) podran coincidir temporalmente y ser asociados.

Se ha comprobado que en este aprendizaje concurrente, juega un papel fundamental el Nervio Vago (Arnedo et al., 1990; 1991; 1993) ya que, la interrupción de esta vía nerviosa impide el aprendizaje (Arnedo y Puerto, 1986; Arnedo et al., 1990; 1991; Arnedo et al., 1993; Zafra et al., 2006; 2007). Concretamente, la axotomía del sistema aferente vagal o la administración subdiafragmática de una neurotoxina como la capsaicina (Zafra et al., 2006) interrumpe el AAG inducido mediante la administración de sodio hipertónico (Arnedo y Puerto, 1986; Arnedo et al., 1990; 1991; Arnedo et al., 1993).

Otra estructura relacionada con el aprendizaje aversivo gustativo concurrente es el Cerebelo. Datos obtenidos en nuestro laboratorio confirman que la lesión de la región Interpósito-Dentado bloquea el aprendizaje aversivo gustativo concurrente, un aprendizaje de tipo implícito, como también ocurre con el condicionamiento clásico (Mediavilla et al., 1998). Asimismo lesiones en la Oliva Inferior, estructura aferente y posible relevo vagal hacia el Cerebelo, provocan también la interrupción del AAG a corto plazo (Mediavilla et al., 1999).

Como se ha mencionado anteriormente, un relevo anatómico del eje vagal y del NTS, es el NPB Medial (NPBm) (Agüero y Puerto, 1986; Arnedo et al., 1991). Distintos estudios han demostrado que esta estructura es esencial en el establecimiento de este aprendizaje (Agüero y Puerto, 1986; Agüero et al., 1996). Contrariamente las lesiones del NPBm no parece afectar al aprendizaje secuencial (Agüero et al., 1996).

Más aún, recientes investigaciones han puesto de manifiesto que las conexiones con el NPB Lateral Externo podría desempeñar un papel crucial en este tipo de aprendizaje (Mediavilla et al., 2000; Zafra et al., 2002). En efecto, lesiones de este subnúcleo impiden el establecimiento del AAG en procedimientos de aprendizaje a corto plazo/ concurrente, sin afectar al aprendizaje secuencial (Mediavilla et al., 2000). También se ha comprobado que las lesiones del NPBl interrumpen el proceso de adquisición de preferencias gustativas concurrentes inducidas por la administración intragástrica de nutrientes predigeridos, sin influir en el aprendizaje de tipo secuencial (Zafra et al., 2002).

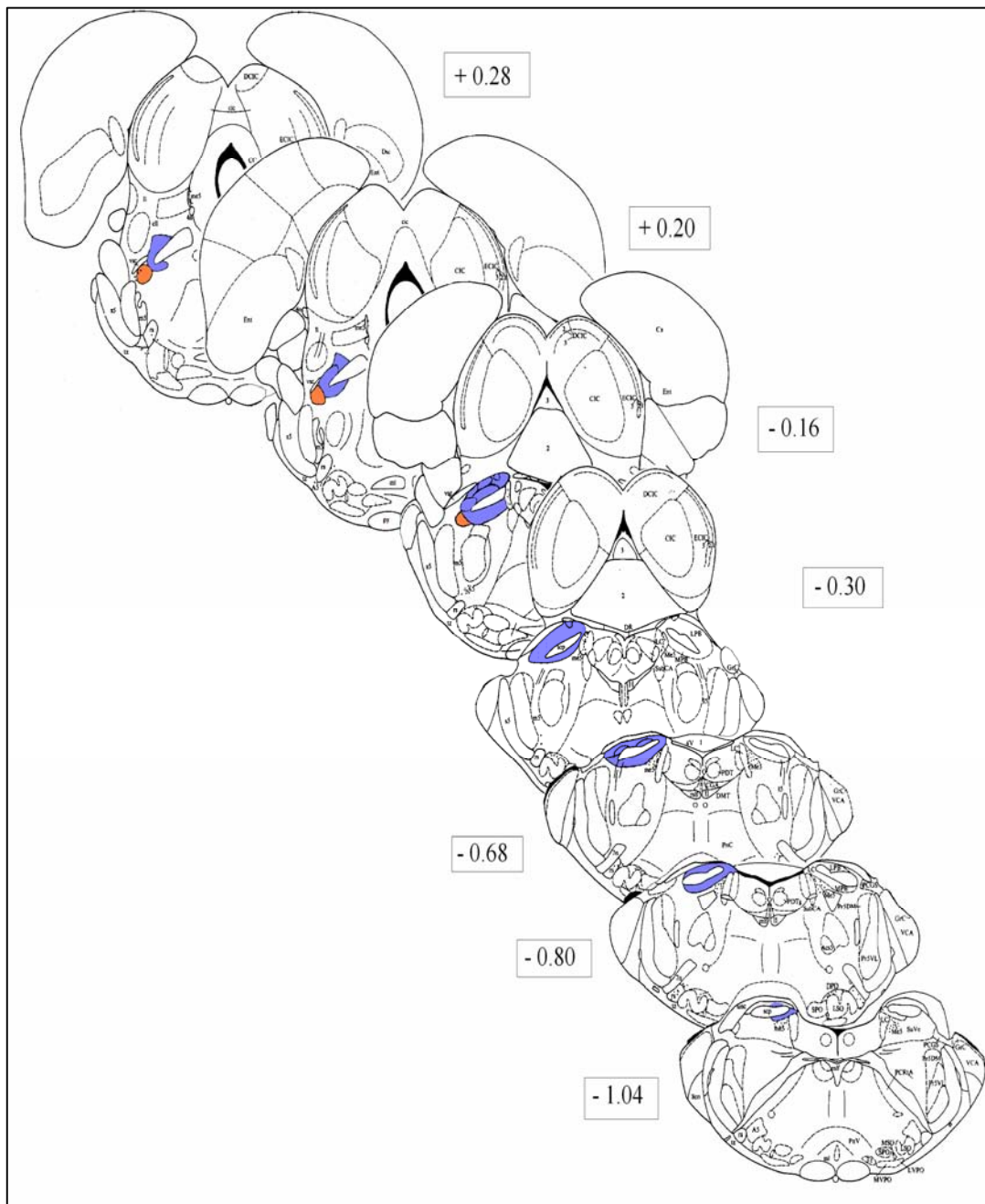
De acuerdo con lo anterior, se puede proponer que el aprendizaje aversivo gustativo o de preferencias gustativas se puede adquirir según dos modalidades de aprendizaje: el Aprendizaje Concurrente, que requiere procesamientos víscero-gustativos rápidos, con contigüidad inter-estímular y que deben producirse en las mismas condiciones en las que adquirió el aprendizaje (implícito). Este aprendizaje implicaría mecanismos neurales de detección visceral vagal (eje gástrico-vagal-NTSc-NPBm y NPBl) (Agüero y Puerto, 1986; Mediavilla et al., 2000; Zafra et al., 2002; 2006; 2007). El Aprendizaje Secuencial, por su parte, es flexible, admite demoras entre estímulos (aprendizaje explícito) (Gallo et al. 1988; 1990; 1991; Arnedo et al., 1990; 1991; 1993), y estructuras como el Área Postrema o el NPBl serían fundamentales (Arnedo et al., 1991; Arnedo et al., 1993; Mediavilla et al., 2000; Zafra et al., 2002). En resumen, los animales pueden utilizar uno u otro, dependiendo de los requerimientos temporales o del tipo de estímulo que se emplee que se procesaría a través de uno u otro eje neuroanatómico, cada uno relacionado con una u otra modalidad de aprendizaje (Kiefer, 1985; Grant, 1987; Arnedo et al., 1990).

### **3. ANATOMÍA Y CITOARQUITECTURA DEL COMPLEJO PARABRAQUIAL**

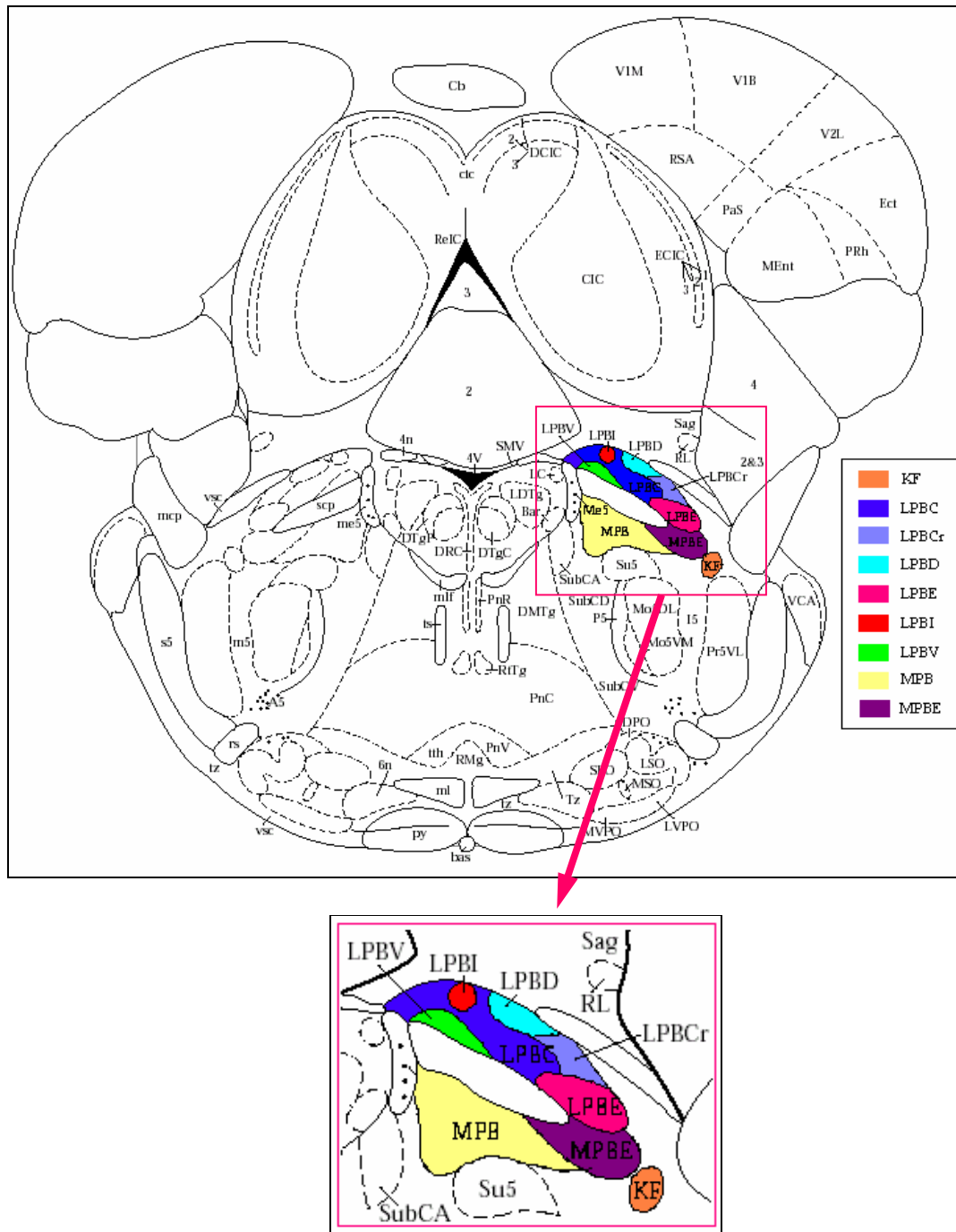
El Complejo Parabraquial, también denominado núcleo marginal del Braquium Conjunctivum (BC), está constituido por un conjunto de neuronas que rodean al Pedúnculo Cerebeloso Superior (PCS) a lo largo del Puente dorsolateral (Fulwiler y Saper, 1984; Block y Hoffman, 1987). Este complejo puede subdividirse en dos grandes áreas, según su posición con respecto al BC: La zona más anterior y dorsal al BC es el Área Parabraquial Lateral (NPBl) y el área más caudal que ocupa la zona ventral y el tercio dorsomedial al BC, que se conoce como Núcleo Parabraquial Medial (NPBm). Además la extensión ventrolateral conocida como “Núcleo de Kölliker-Fuse”, también forma parte de este Complejo Parabraquial (ver Figura 10).

En los últimos años, se han descrito hasta catorce subnúcleos parabraquiales distintos (ver Figura 11), que difieren tanto a nivel citológico como en cuanto a las conexiones anatómicas, aferentes y eferentes, que mantienen (ver Figuras 11, 13 y 14), así como en los tipos de neurotransmisores que utilizan (Fulwiler y Saper, 1984; Milner et al., 1984; Milner et al., 1986; Pammer et al., 1988; Paxinos y Watson, 1996).





**Figura 10.** Secciones transversales del Área Parabraquial (en color azul) y del Núcleo Kölliker-Fuse (en color naranja) en dirección rostro-caudal. En los laterales se indica la distancia en milímetros respecto al plano interaural (Adaptado de Paxinos y Watson, 1996).



**Figura 11.** Subnúcleos que forman el Complejo Parabraquial (Bregma = -9.16 mm). Abreviaturas: KF: Núcleo Kölliker Fuse; LPBC: Subnúcleo Parabraquial Lateral Central; LPBCr: Subnúcleo Parabraquial Lateral Creciente; LPBD: Subnúcleo Parabraquial Lateral Dorsal; LPBE: 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).

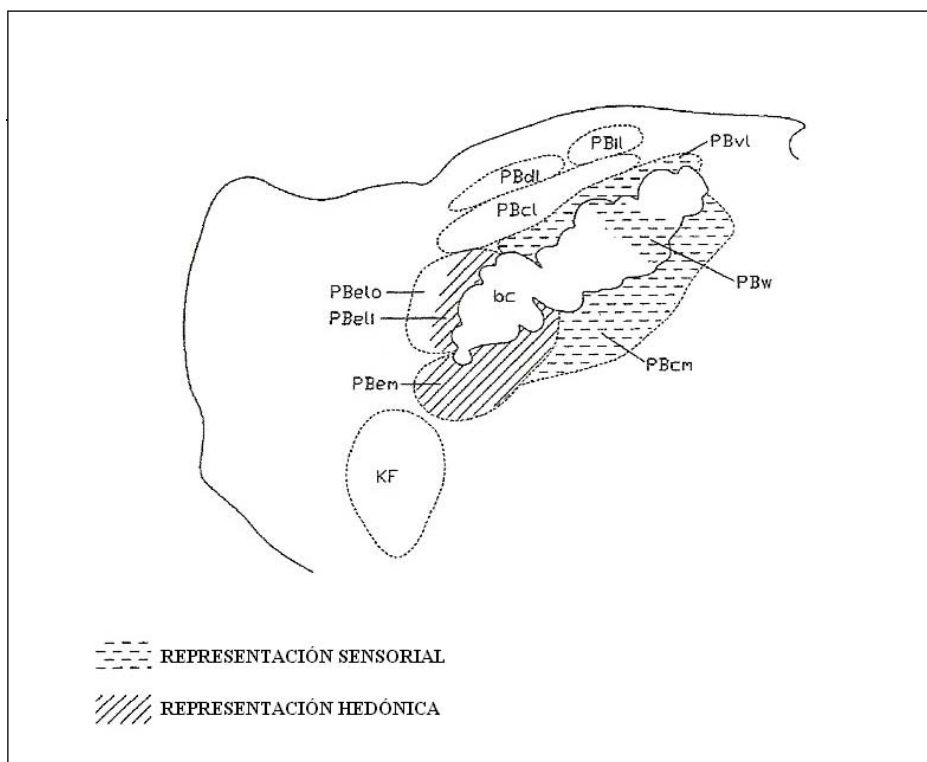
### **3.1. NÚCLEO PARABRAQUIAL MEDIAL (NPBm).**

El NPBm está formado por una población heterogénea de células que ocupan una posición ventral y medial con respecto al BC. Morfológicamente se han diferenciado básicamente tres tipos de células: Una población de neuronas pequeñas y redondeadas que ocupan los dos tercios caudales del núcleo. Un segundo grupo de células de mayor tamaño, fusiformes y multipolares concentradas en una posición horizontal, aunque también se han encontrado en los dos tercios caudales del núcleo pero concentradas principalmente en el borde ventro-lateral. Y por último, una población de neuronas poligonales de tamaño medio situada en los dos tercios rostrales del área medial. Existe un excepción a esta heterogeneidad y es el Subnúcleo Medial Externo. Está constituido por neuronas multipolares con largos axones orientados horizontalmente que constituyen una banda estrecha que se interpone entre el Núcleo Kölliker y el Pedúnculo Cerebeloso Superior (Fulwiler y Saper, 1984; Davis, 1991).

#### **3.1.1. AFERENCIAS DEL NÚCLEO PARABRAQUIAL MEDIAL.**

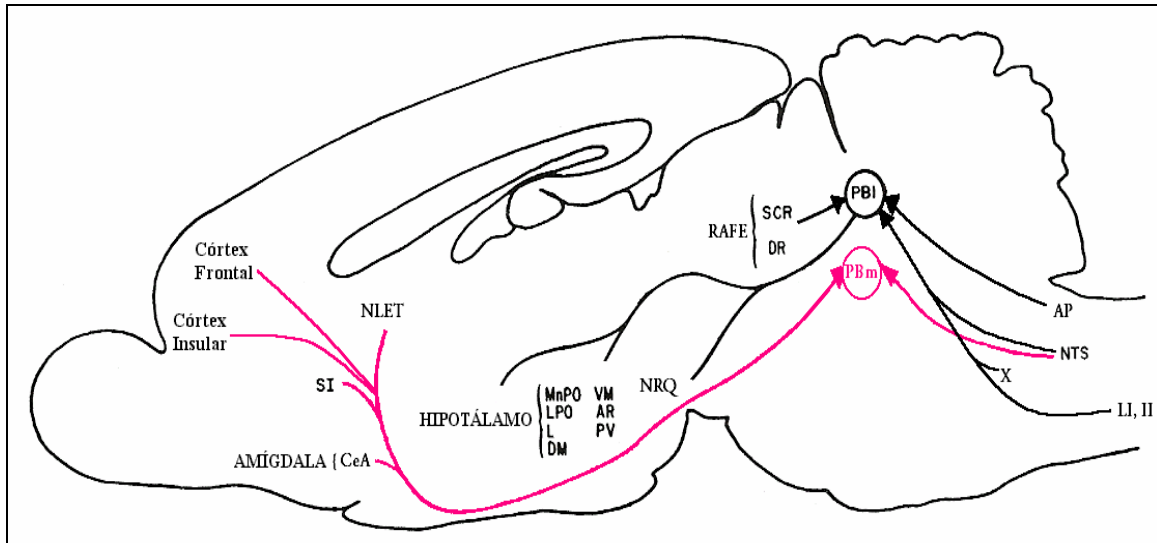
Mediante estudios de trazado anatómico con Peroxidasa (HRP) se ha comprobado que las principales aferencias que recibe el NPBm (ver Figura 13) proceden del área anterior del NTS, área Bulbar relacionada con el procesamiento gustativo y que constituye así el principal relevo anatómico de la información gustativa hacia estructuras superiores (Norgren y Pfafmann, 1976; Fulwiler y Saper, 1984). Los estudios neurofisiológicos confirman también la existencia de esta importante proyección aferente gustativa desde distintas zonas del NTS al NPBm (Ogawa et al., 1984; Hayama et al., 1987; Travers et al., 1987; Di Lorenzo, 1988; Travers, 1988).

También se han descrito aferencias viscerales vagales que proyectan al NPBm a través de fibras ventrolaterales que parecen converger y solaparse con las fibras gustativas (ver Figura 12) (Hermann y Rogers, 1985; Kobashi y Adachi, 1986; Han et al., 1991). Investigaciones llevadas a cabo con c-Fos, confirman que el NPBm procesa la información de tipo gustativo y visceral vagal (Kobashi et al., 1993).



**Figura 12.** Localización de las representaciones hedónica y sensorial del gusto en el Complejo Parabraquial. Abreviaturas: bc, Braquio Conjuntivo; KF, Núcleo Kölliker-Fuse; PBcl, Subnúcleo Lateral Central; PBcm, Subnúcleo Medial Central; PBdl, Subnúcleo Lateral Dorsal; Pbeli, parte interna del Subnúcleo Lateral Externo; Pbedo, parte externa del Subnúcleo Lateral Externo; Pbem, Subnúcleo Medial Externo; Pbil, Subnúcleo Lateral Interno; PBvl, Subnúcleo Ventrolateral; PBw, Área Waist. (Adaptado de Sowards, 2004).

Finalmente, el NPBM también recibe aferencias de distintas áreas del prosencéfalo basal como el Núcleo Central de la Amígdala, la Sustancia Innominada y el Núcleo Lecho de la Estría Terminal así como de la Corteza Insular Posterior (Moga et al., 1990; Di Lorenzo y Monroe, 1992). Mediante técnicas de trazado axónico anterógrado y retrógrado, se ha comprobado que el NPBM mantiene conexiones recíprocas con el CórTEX Frontal y que tanto este núcleo como el NTS reciben un control centrífugo desde áreas corticales frontales, principalmente insulares (ver Figura 13) (Saper, 1982; Shipley y Sanders, 1982; Shipley y Geinisman, 1984).



**Figura 13.** Representación esquemática de las fibras aferentes al Complejo Parabraquial. En color negro aparecen las aferentes del Núcleo Parabraquial Lateral (PBI) y en rosa, las correspondientes al Núcleo Parabraquial Medial (PBm). Abreviaturas: AR, Núcleo “Arcuate” del Hipotálamo; AP, Área Postrema; CeA, Núcleo Central de la Amígdala; DM, Núcleo Dorsomedial del Hipotálamo; L, Hipotálamo Lateral; LI,II, Láminas 1 y 2 de la Sustancia Gris Medular; LPO, área Preóptica Lateral; MnPO, Núcleo Preóptico Mediano; NLET, Núcleo Lecho de la Estría Terminal; NRQ, Núcleo Retroquiasmático; NTS, Núcleo del Tracto Solitario; RAFE, Núcleos del Rafe: DR, Núcleo Dorsal del Rafe y SCR, Núcleo Superior Central del Rafe; PV, Núcleo Paraventricular del Hipotálamo; SI, Sustancia Innominada; VM, Núcleo Ventromedial del Hipotálamo; X, Décimo par craneal (Vago) (Adaptado y modificado de Saper y Loewy, 1980).

### 3.1.2. EFERENCIAS DEL NÚCLEO PARABRAQUIAL MEDIAL.

El NPBm envía conexiones eferentes que proyectan hacia distintas estructuras mesencefálicas y diencefálicas (ver Figura 14). Así, esta estructura mantiene amplias conexiones con el Hipotálamo (a excepción de los Cuerpos Mamilares), principalmente con la zona posterior del Hipotálamo Lateral (Fulwiler y Saper, 1984; Ferssiwi et al., 1987; Bester et al., 1997).

Se han descrito eferencias de toda la parte medial del PB hacia el Complejo Ventrobasal del Tálamo (zona que ha sido identificada como área receptiva gustativa), sobre todo a la parte más ventral (Fulwiler y Saper, 1984; Halsell, 1992; De Lacalle y Saper, 2000).

Otros haces de fibras procedentes del NPBM así como del área “Waist” (zona que comprende la parte dorsal del NPBM y el NPB Lateral Ventral, solapándose en parte con el PCS, ver Figura 12) finalizan en el Núcleo Central y Basolateral de la Amígdala (BLA) así como en la Corteza Amigdalina (CoA) (Saper y Loewy, 1980; Fulwiler y Saper, 1984; Bernard et al., 1993) y el área de transición amigdalopiriforme (Santiago y Shammah-Lagnado, 2005).

También, se ha demostrado que el Córtex Lateral Frontal, Insular e Infralímbico reciben numerosos axones de neuronas multipolares de la zona caudo-medial así como del Subnúcleo Medial Externo del Parabraquial (NPBme) (Fulwiler y Saper, 1984; Bernard et al., 1991; Halsell, 1992; De Lacalle y Saper, 2000). En efecto, estudios con marcadores retrógrados demuestran una conexión desde los dos tercios más caudales del NPBM hasta la capa Agranular y Granular de la Corteza Insular Anterior y Posterior (zonas implicadas en el procesamiento de la información de tipo gustativo y visceral, respectivamente) (Saper y Loewy, 1980; Fulwiler y Saper, 1984; Yasui et al., 1985; Cechetto y Saper, 1987; Ito, 1992).

Por último, otras zonas de proyección eferente del NPBM incluyen el Núcleo Ambiguo (Fulwiler y Saper, 1984), la parte medial del Núcleo Espinal Trigeminal (Hayakawa et al., 1999), el Sistema Reticular (Holstege, 1988), la Sustancia Innominada, el Globo Pálido ventral; el Área Subestriada, el “Fundus Striati” (o Núcleo Intersticial de la parte posterior del Miembro de la Comisura Anterior) y la Zona Incierta (Fulwiler y Saper, 1984; Bernard et al., 1993; Alden et al., 1994).

### **3.2. NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL (NPBI).**

El Núcleo Parabraquial Lateral está situado en una posición más anterior y dorsal al BC y termina en la entrada del Pedúnculo (Saper y Loewy, 1980). Está constituido por un conjunto de subnúcleos celulares que poseen unas características morfológicas homogéneas y una posición espacial que los hace fácilmente dissociables, así tenemos (ver Figura 11):

1. El Núcleo Lateral Superior (s) que constituye la subdivisión principal y está formado por neuronas multipolares o piramidales de tamaño mediano y que se extienden dorsalmente al nivel en que el Colículo Superior se separa del puente.

2. El Núcleo Lateral Interno (i), formado por células redondeadas y que ocupa una posición más medial y posterior que el lateral superior.
3. El Núcleo Lateral Central (c), es el mayor de los subnúcleos laterales y ocupa la mayor parte de la superficie dorsal del PCS en los dos tercios rostrales del NPB. Se compone de neuronas ovoides o fusiformes, ventrolaterales a la Sustancia Gris Central, y su extremo posterior lo delimita el ensanchamiento del Pedúnculo Cerebeloso Superior. El extremo más ventrolateral de este subnúcleo ha sido denominado NPB Lateral “Creciente”.
4. El Núcleo Lateral Ventral (v) que consiste en una banda de células de gran densidad, localizadas en una posición ventrolateral al núcleo central.
5. El Núcleo Lateral Dorsal (d), que es un cúmulo de neuronas pequeño cuyo límite dorsal es el Tracto Espinocerebral y el ventral es el Núcleo Central.
6. El Núcleo Lateral Externo (e) y el Núcleo Lateral Extremo (ex). Estos dos subnúcleos se localizan en el extremo más lateral y están constituidos por células multipolares de mayor tamaño. Los límites entre ambos son fácilmente distinguibles: el Núcleo Lateral Externo se extiende más caudalmente, casi en el punto en que el PCS hace contacto con la superficie dorsal del puente y lo rodea por su borde dorsolateral (Fulwiler y Saper, 1984; Moga et al., 1990); mientras que el Núcleo Lateral Extremo continúa y contacta en la zona más lateral con el Núcleo Medial, situado ventrolateralmente al BC (Fulwiler y Saper, 1984). Sin embargo algunos autores los consideran como un único agrupamiento (Swanson, 1992; Paxinos y Watson, 1996).

### **3.2.1. AFERENCIAS DEL NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL.**

El área Parabraquial Lateral recibe aferencias principalmente desde estructuras troncoencefálicas como el NTS y desde áreas viscerales implicadas en el control de funciones autonómicas (Loewy y Burton, 1978).

Aunque la parte caudal del NTS es el primer relevo anatómico central en la transmisión de la información visceral mediante el Nervio Vago y también de algunos nervios Espláncnicos (Yuan y Barber, 1991), un grupo reducido de fibras vagas proyectan directamente al NPBl (Herbert et al., 1990; Yuan y Barber, 1991; Yamamoto et al., 1992; Saleh y Cechetto, 1993; Gieroba y Blessing, 1994; Karimnamazi et al., 2002) y concretamente parece que el Núcleo Parabraquial Lateral Externo es uno de los principales objetivos de estos axones (Herber y Flügge, 1995).

Mediante técnicas de trazado funcional con c-Fos y neurofisiológicas, se ha comprobado que la porción anterior gustativa del NTS proyecta a través de una vía gustativa dorsal, al subnúcleo Central del área Lateral (Ogawa et al., 1984; Travers, 1988; Yamamoto et al., 1992; Yamamoto et al., 1993). La porción posterior del NTS, relacionada con la transmisión de información visceral, proyecta directamente sobre el subnúcleo Externo, Ventral y Extremo (Yamamoto et al., 1993; Kobashi y Adachi, 1986; Kobashi et al., 1993; Han et al., 1991).

El área Postrema también envía proyecciones al subnúcleo Extremo y Externo del NPBl (Van der Kooy y Koda, 1983; Kobashi et al., 1993; Yamamoto et al., 1992; Yamamoto et al., 1993), al parecer, a través de una vía serotoninérgica (Lança y Van der Kooy, 1985; Miceli et al., 1987; Angel et al., 1993).

Además el NPBl, principalmente los subnúcleos interno y central, recibe conexiones directas desde la Médula (Láminas I y II), transmitiendo así la información nociceptiva y termorreceptiva (Yamada y Kitamura, 1992; Light et al., 1993; Slugg y Light, 1994; Saper, 1995 a; Mitchell et al., 2004).

Otras aferencias parabraquiales procedentes de estructuras diencefálicas y prosencefálicas son: Desde el Hipotálamo, áreas Preóptica Lateral y Medial, Paraventricular, Dorsomedial y Ventromedial, Lateral y Núcleo Retroquiasmático, se envían axones hacia los subnúcleos Parabraquiales Central y Dorsal (Moga et al., 1990; Krukoff et al., 1994). Estos subnúcleos también reciben proyecciones desde el Córtex Prefrontal Lateral e Infralímbico (Moga et al., 1990; Di Lorenzo y Monroe, 1992) (ver Figura 13).



### **3.2.2. EFERENCIAS DEL NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL.**

El Área Lateral del Complejo Parabraquial constituye un núcleo de relevo pontino de información visceral que, mediante su sistema de conexiones eferentes, relaciona estructuras inferiores con centros talámicos, hipotalámicos, límbicos y corticales (ver Figura 14) (Fulwiler y Saper, 1984; Bernard et al., 1991; Halsell, 1992; Petrov et al., 1992a, b; Bernard et al., 1993; Krukoff et al., 1993; Alden et al., 1994; Dobolyi et al., 2005). Este área también envía eferencias descendentes hacia el NTS, el Bulbo Ventrolateral, la Formación Reticular Bulbar, los Núcleos del Rafe, el Complejo Nuclear Sensorial del Trigémino y las Astas Dorsales Espinales (estas dos últimas reciben proyecciones procedentes casi exclusivamente del Núcleo de Kölliker-Fuse) (Fulwiler y Saper, 1984; Herbert et al., 1990; Bernard et al., 1991; Halsell, 1992; Petrov et al., 1992a, b; Bernard et al., 1993; Krukoff et al., 1993; Alden et al., 1994; Yoshida et al., 1997). También existen proyecciones descendentes hacia motoneuronas faríngeas procedentes de la porción ventrolateral del NPB (Núcleo de Kölliker, NPB Lateral Creciente y NPB Lateral Externo) (Hayakawa et al., 1999).

Distintas investigaciones han demostrado que el NPBl envía numerosas fibras que proyectan hacia distintas estructuras hipotalámicas, principalmente, al Área Preóptica Medial (desde del NPBlc y en menor medida desde el NPBl e y NPBl d); al Hipotálamo Medial (desde el NPBl Superior, Central, Extremo, Dorsal y Externo); al complejo Hipotalámico Dorsomedial y Ventromedial (desde el NPBl Superior); al Hipotálamo Lateral (desde el NPBl Externo, Medial Externo y del área Waist), al Núcleo Paraventricular del Hipotálamo (desde los subnúcleos PB Lateral Superior y Externo) y a la Zona Incierta (desde el NPBl Ventral), al Área Retroquiasmática, (desde el NPBl Superior y Dorsal) y por último se han establecido conexiones mas difusas entre los núcleos Parabraquiales Laterales y otras dos áreas hipotalámicas: las zonas Subfornical Tuberal y Dorsomedial (Fulwiler y Saper, 1984; Bernard et al., 1991; Halsell, 1992; Bernard et al., 1993; Krukoff et al., 1993; Alden et al., 1994; Bester et al., 1997; Dobolyi et al., 2005).

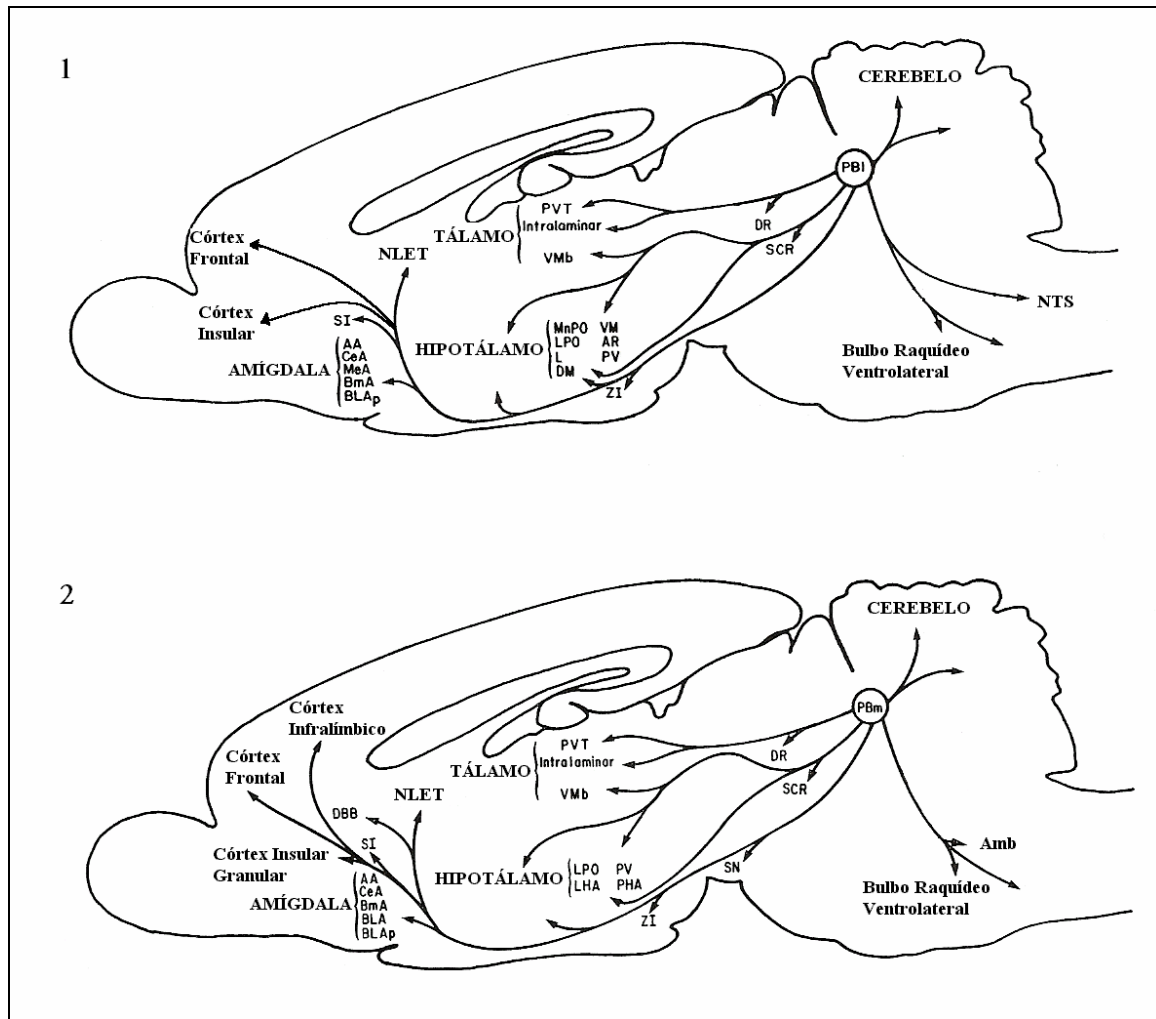
Las proyecciones eferentes hacia el Tálamo proceden fundamentalmente de los subnúcleos Parabraquiales Laterales Dorsal y Externo con respecto al Núcleo Paraventricular (Fulwiler y Saper, 1984; Halsell, 1992; Krukoff et al., 1993; Saleh y Cechetto, 1993; Krout y Loewy, 2000); desde el NPBl Interno y en menor medida desde subnúcleos Mediales y Laterales hacia los Núcleos Intralaminares (Fulwiler y Saper, 1984;

Halsell, 1992; Saleh y Cechetto, 1993; Krukoff et al., 1993; Krout y Loewy, 2000); desde el NPB Lateral Ventral, Lateral Externo y Medial externo hacia el Núcleo Caudal Ventromedial (nociceptivo) (Krout y Loewy, 2000), y por último, se ha comprobado que las células que rodean al Pedúnculo Cerebeloso Superior, incluyendo los subnúcleos Mediales, 'Waist', Lateral Ventral y Lateral Externo proyectan sobre el Núcleo Ventral Posterior Parvicelular (VPpc) Talámico (Krout y Loewy, 2000). Este sistema diencefálico de múltiples conexiones, parece estar implicado en el control de las funciones autonómicas, nutritivas, endocrinas y viscerales (Norgren, 1985; Han et al., 1991).

Distintas investigaciones neurofisiológicas y anatómicas, han puesto de manifiesto la existencia de una amplia red de conexiones entre grupos celulares del Núcleo Parabraquial (concretamente los subnúcleos Lateral Externo, Central y Dorsal, Medial Externo, y del área Waist) y diversas estructuras prosencefálicas (Saper y Loewy, 1980; Fulwiler y Saper, 1984; Bernard et al., 1991; Halsell, 1992; Bernard et al., 1993; Alden et al., 1994; Jia et al., 1994; De Lacalle y Saper, 2000; Dobolyi et al., 2005).

En este sentido se han identificado proyecciones anatómicas sobre el Núcleo Lecho de la Estría Terminal, el área Amigdalina Anterior y los núcleos Ventral, Central, Medial y Lateral de la Amígdala (Saper y Loewy, 1980; Fulwiler y Saper, 1984; Yamamoto et al., 1984; Bernard et al., 1991; Halsell, 1992; Bernard et al., 1993; Alden et al., 1994; Jia et al., 1994; De Lacalle y Saper, 2000; Dobolyi et al., 2005; Jia et al., 2005), la Sustancia Innominada (Fulwiler y Saper, 1984; Bernard et al., 1993; Alden et al., 1994). Asimismo se han descrito nuevas proyecciones eferentes desde el PBI hacia el Núcleo Intersticial de la parte posterior del Miembro (limb) de la Comisura Anterior, la zona de transición límbico-olfatoria, el núcleo Lateral del Tracto Olfatorio y el Septum Lateral Anterior (Dobolyi et al., 2005) (ver Figura 14).

Por último, existen distintas áreas corticales que reciben fibras procedentes del NPBI como son el área Septo-Olfatoria, Córtex Prefrontal Medial, el Córtex Fronto-Lateral y la Corteza Insular. Estas estructuras reciben información desde el NPBI Ventral y Externo (Fulwiler y Saper, 1984; Halsell, 1992; Dobolyi et al., 2005). Además, la Corteza Insular recibe proyecciones del NPBI de forma indirecta a través del Tálamo (Lasiter, 1985; Lasiter et al., 1985) y de una vía polisináptica desde el Complejo Amigdalino (Yamamoto et al., 1984; Lasiter y Glanzman, 1985).



**Figura 14.** Representación gráfica de las fibras eferentes procedentes del Complejo Parabraquial: 1. Parabraquial Lateral (PBL); 2: Parabraquial Medial (PBM). Abreviaturas: AA, Área Amigdalina Anterior; Amb, Núcleo Ambiguo; ARH, Núcleo “Arcuate” del Hipotálamo; APOM, Área Preóptica Medial; BLA, Núcleo Basolateral de la Amígdala; BmA, Núcleo Basomedial de la Amígdala; BLAp, Núcleo Basolateral Posterior de la Amígdala; CeA, Núcleo Central de la Amígdala; DM, Núcleo Dorsomedial del Hipotálamo; DR, Núcleo Dorsal del Rafe; DBB, Núcleo de la Banda Diagonal de Broca; HLA o L, Área Hipotalámica Lateral; LPO, Área Preóptica Lateral; MnPO, Núcleo Preóptico Mediano; NLET, Núcleo Lecho de la Estría Terminal; NTS, Núcleo del Tracto Solitario; VMb, Núcleo Ventromedial Basal del Hipotálamo; PHA, Área posterior Hipotalámica; PV, Núcleo Paraventricular del Hipotálamo; PVT, Núcleo Paraventricular del Tálamo; SCR, Núcleo Superior Central del Rafe; SI, Sustancia Innominada; SN, Sustancia Negra; VM; Núcleo Ventromedial del Hipotálamo; ZI, Zona Incierta (Adaptado de Saper y Loewy, 1980).

### **3.3. SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN LOCALIZADOS EN EL COMPLEJO PARABRAQUIAL.**

El Complejo Parabraquial y las funciones de índole gustativo, viscerosensorial y nociceptivo que lleva a cabo (Fulwiler y Saper, 1984; Herbert et al., 1990; Bernard et al., 1994; Yoshida et al., 1997; Gauriau y Bernard, 2002; Chen et al., 2004) implican un gran número de sistemas de neurotransmisión, tanto excitadores como inhibidores.

En este sentido, se han identificado células **colinérgicas** y **dopaminérgicas** en las vías descendentes desde el NPB Lateral hacia estructuras inferiores del Tronco Cerebral (Katayama et al., 1984; Herbert et al., 1990; Yoshida et al., 1997; Kubo et al., 1998).

La función de **GABA** en el Complejo Parabraquial no ha sido limitada a la transmisión de información relacionada con el dolor, sino que se ha comprobado que la presencia de GABA A en el NTS y en las áreas parabraquiales puede estar relacionada con el procesamiento de la información gustativa y con la función visceral (Kobashi y Bradley, 1998). En este sentido, se ha comprobado que la administración de benzodiacepinas (sustancias que interactúan con el receptor GABA) en el NPB provoca un aumento en la ingesta como consecuencia de una potenciación de la valoración hedónica positiva que el sujeto hace de un estímulo gustativo (Söderpalm y Berridge, 2000).

Por otra parte, algunos de los haces de fibras que establecen contactos con el Núcleo Parabraquial, y que proceden del Área Postrema, liberan **serotonina** como neurotransmisor (Lança y Van der Kooy, 1985). También se ha comprobado la presencia de fibras serotoninérgicas difusas en el Núcleo Parabraquial Lateral (Fay y Kubin, 2000). Asimismo, se ha visto que la Fenfluramina (agonista serotoninérgico) es procesada principalmente en el NPBl Externo, y en menor grado en el NPB Medial, Lateral Dorsal, Núcleo de Kölliker y Núcleo Cuneiforme, donde podría interactuar con el Sistema Opiáceo (Li y Rowland, 1993; 1995; Li et al., 1994).

Se han localizado notables cantidades de receptores opiáceos  $\mu$  y  $\kappa$  en el Complejo Parabraquial (Mansour et al., 1995), y más concretamente se ha descrito la presencia de

receptores **opiáceos**  $\mu$  en cuerpos celulares y ramificaciones dendríticas de las subdivisiones Parabraquiales Lateral y Medial, relacionados, posiblemente, con la modulación del dolor, aunque también con el procesamiento de información viscerosensorial relacionada con el gusto y la ingesta de alimento (Mansour et al., 1994; Ding et al., 1996; Chamberlin et al., 1999; Mitchell et al., 2004).

La síntesis de opiáceos endógenos como las dinorfinas y las encefalinas en las neuronas parabraquiales sigue un patrón diferencial, y así se ha encontrado Pre-pro-encefalina en los subnúcleos Parabraquiales Laterales Externo, Ventral, Interno y Núcleo de Kölliker, y Pre-pro-dinorfina en los subnúcleos PBI Dorsal y PBI Central principalmente (Hermanson y Blomqvist, 1997; Hermanson et al., 1998). En este sentido, se ha descrito una proyección encefalinérgica desde el NTS al NPB, que posiblemente estaría implicada en la regulación de funciones autonómicas (Maley y Panteón, 1988).

Por su parte, la Pre-Pro-orfanina ha sido localizada en la división Lateral del NPB y en menor medida en el NPB Medial (Neal et al., 1999; 2003). Esta sustancia ha sido implicada en múltiples funciones tales como el control cardiovascular, el aprendizaje, la ingesta o en las respuestas nociceptivas, haciendo descender el umbral del dolor (Akil et al., 1997; Neal et al., 1999; 2003). También, se ha descrito una proyección eferente peptidérgica del NPBI hacia los Núcleos del Rafe, que al parecer estaría relacionada con la regulación y el procesamiento sensorial del dolor y la analgesia (Saper y Loewy, 1980; Fulwiler y Saper, 1984; Holstege, 1988; Petrov et al., 1992; Terenzi et al., 1992).

Otras sustancias presentes en el Complejo Parabraquial son las prostaglandinas. Receptores EP3 y EP4 han sido identificados en distintos subnúcleos del Parabraquial. Con respecto a los receptores EP3 han sido localizados en los núcleos Lateral Externo, Dorsal Lateral, Lateral Superior, Lateral Central y Kölliker-Fuse. Por su parte los receptores EP4, se encuentran en el Núcleo Superior Lateral y la parte adyacente de los núcleos Lateral Dorsal y Central del PB (Engblom et al., 2000). Los resultados obtenidos en este estudio sugieren, según estos autores, que estos receptores podrían mediar distintas funciones en el PB como la regulación de la presión arterial, la conducta ingestiva o el procesamiento de la información nociceptiva.

Por otro lado, se han identificado receptores para el **glutamato** (neurotransmisor excitador) del tipo *GluR1 $\alpha$*  en los subnúcleos PBI Central, PBI ‘Creciente’, Núcleo de

Kölliker y área de 'Waist', y GluR2/3 en el NPBI Externo (Chamberlin y Saper, 1995; Guthmann y Herbert, 1999).

Receptores **adrenérgicos**  $\alpha_2$  también han sido localizados en el Núcleo Lateral Externo, el área Waist y el Núcleo Lateral así como en el Núcleo Medial Externo del Complejo Parabraquial y en menor medida en el PBm, y el Núcleo Lateral Interno (Kawai et al., 1988; Herber y Flügge, 1995).

Finalmente, se ha detectado la presencia de otros neurotransmisores en el NPBI tales como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, hormona liberadora de corticotropina, sustancia P, somatostatina, neurotensina, colecistoquinina, etc. (Kainu et al., 1993; Saleh y Cechetto, 1993; Carlson et al., 1994; De Lacalle y Saper, 2000).

## 4. ANATOMÍA Y CITOARQUITECTURA DE LA CORTEZA INSULAR.

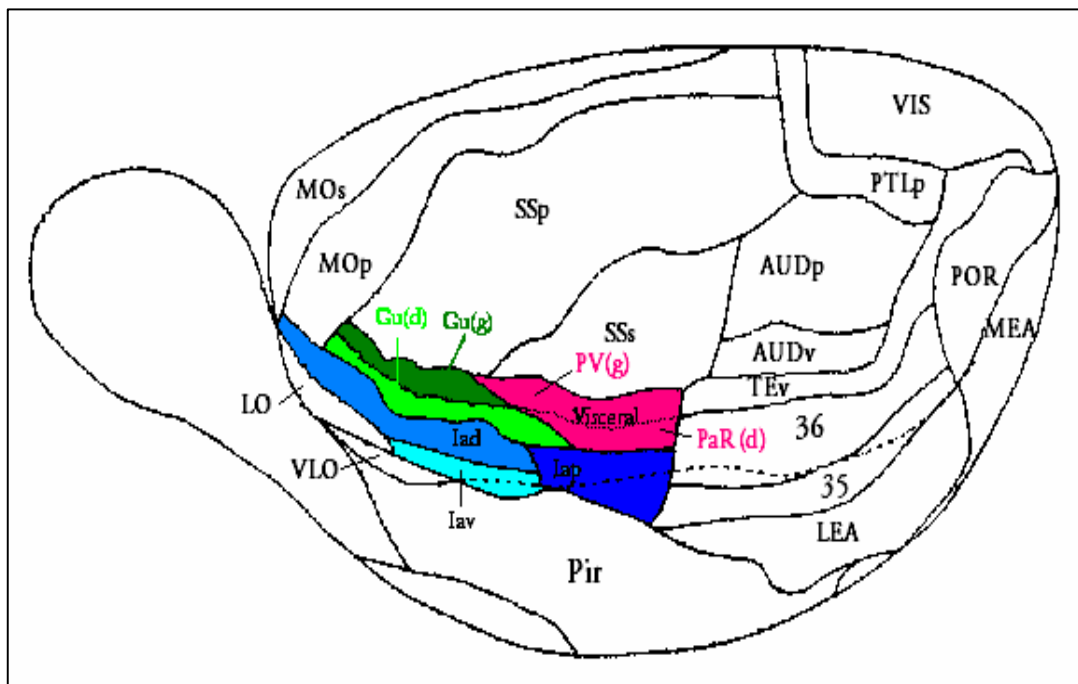
La CI podría definirse como una franja de tejido cortical que se origina en el límite superior del Surco Rinal, y se extiende dorsalmente hasta los bordes de las Áreas Somatosensoriales Primaria y Secundaria, y el Córtex Piriforme, limitando caudalmente con el Córtex Perirhinal (ver Figura 15) (Kosar et al., 1986a; Cechetto y Saper, 1987; Zilles, 1990; Saper, 1995, 2004; Shi y Cassell, 1998; Sowards y Sowards, 2001).

La CI es un área cortical heterogénea, en cuya dimensión dorsoventral podemos diferenciar tres regiones (granular, disgranular y agranular), atendiendo a su organización citoarquitectónica y a las conexiones anatómicas que éstas mantienen (ver Figuras 16, 17 y 18) (Cechetto y Saper, 1987; McDonald, 1998; Shi y Cassell, 1998; Sowards y Sowards, 2001).

A nivel más dorsal existe una región **Granular**. Esta zona se localizaría inmediatamente ventral a las Áreas Somatosensoriales Primaria y Secundaria (Shi y Cassell, 1998). Debido a las aferencias viscerales que recibe, esta región es considerada como un área cortical víscerosensorial general (Cechetto y Saper, 1987; Ogawa et al., 1990; Zilles, 1990; Augustine, 1996; King et al., 1999; Zhang y Oppenheimer, 2000), en la cual se observa una organización topográfica, en la que las neuronas mecanorreceptoras que responden a estímulos periorales y gástricos se localizan a nivel rostral y dorsal, junto al área gustativa (disgranular), mientras que las que responden a funciones cardiovasculares o respiratorias estarían localizadas caudalmente (Cechetto y Saper, 1987; Ogawa et al., 1990). Este patrón de organización diferenciado como el que presenta el NTS, proporciona evidencia sobre el estricto mantenimiento de la ordenación topográfica que existe a lo largo de la vía visceral sensorial que va al córtex cerebral (Saper, 1995; 2004).

A continuación, encontramos un área intermedia que es fundamentalmente **Disgranular** y que caudalmente, se fundiría de forma casi imperceptible con el Córtex

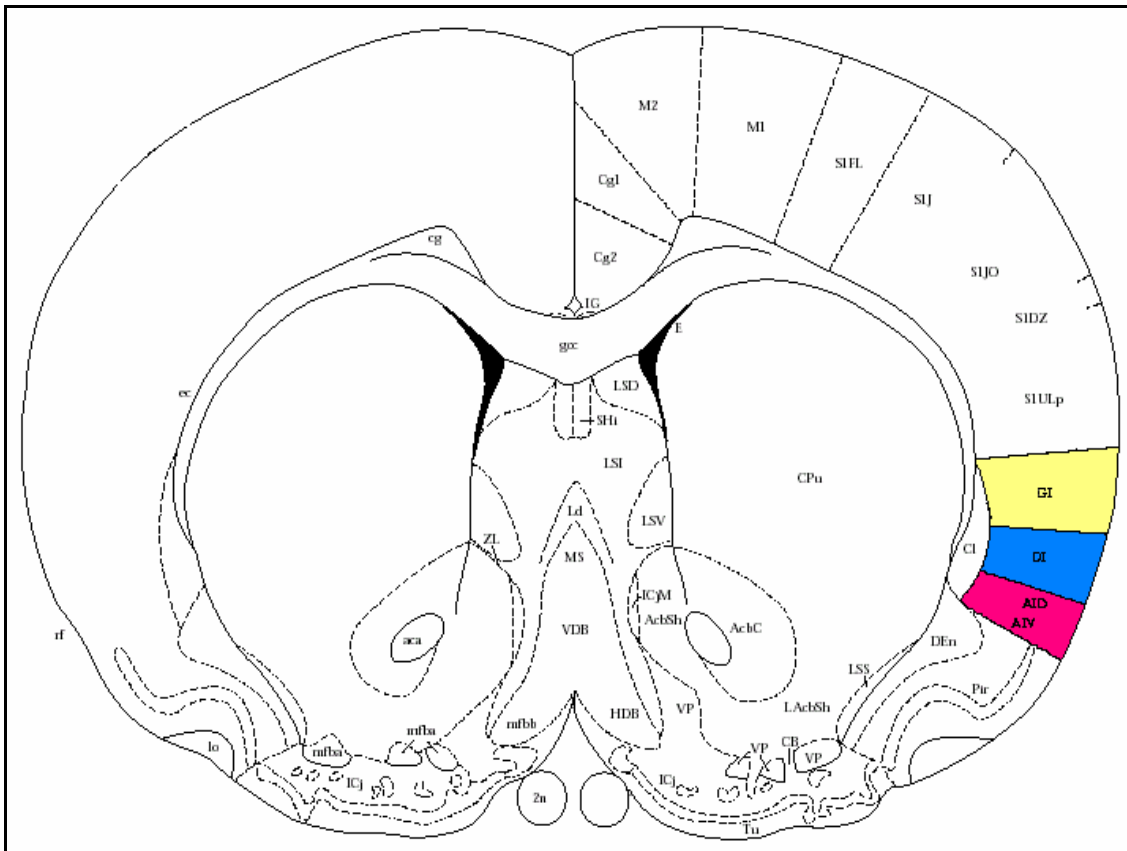
Perirhinal (ver Figura 15). La parte anterior del Córtex Disgranular está considerado por algunos autores como el córtex gustativo primario en la rata (Kosar et al., 1986a; Cechetto y Saper, 1987). Así se ha demostrado que las neuronas gustativas que responden a los cuatro sabores básicos (dulce, salado, amargo y ácido) se encuentran principalmente en esta región disgranular (aunque también se han descrito neuronas que responden específicamente al sabor en la Corteza Insular Granular) (Cechetto y Saper, 1987; Ogawa et al., 1990; Swards y Swards, 2001).



**Figura 15.** Representación esquemática de la cara lateral del córtex de la rata, mostrando las divisiones de la Corteza Insular. Abreviaturas: 35 y 36, Áreas del Córtex Perirhinal; AUDp, Área Auditiva Posterior; AUDv, Área Auditiva Ventral; Gu (d), Córtex Insular Gustativo Disgranular (en color verde claro); Gu (g) Córtex Insular Gustativo Granular (en color verde oscuro); Iad, Córtex Insular Agranular Dorsal (en azul claro); Iap, Córtex Insular Agranular Posterior (en azul oscuro); Iav, Córtex Insular Agranular Ventral (en azul turquesa); Visceral, Área Insular Visceral (PVg, Área Parietal Ventral Granular y PaRd, Área Parietal Rinal Disgranular) (en rosa); LEA, Córtex Entorrinal Lateral; LO, Área Lateral Orbital; MEA, Córtex Entorrinal Medial; MOp, Área Motora Primaria; MOs, Área Motora Secundaria; Pir, Córtex Piriforme; POR, Área Postrhinal; PTLp, Área Parietal Posterior; SSp, Área Somatosensorial Primaria; SSs, Área Somatosensorial Secundaria; Tév, Área Temporal Ventral; VIS, Córtex Visual; VLO, Área Orbital Ventrolateral (Adaptado de Swards y Swards, 2001).



Por último, a nivel más ventral y ocupando predominantemente el territorio caudal de la CI, se localiza la zona **Agranular** dorsal, limitando ventralmente con el Córtez Piriforme (Cechetto y Saper, 1987). Algunos autores consideran que, dadas la conexiones anatómicas que mantiene (ver apartado de Conexiones anatómicas de la Corteza Insular, pág. 79), esta porción de la CI juega un papel fundamental en la percepción del sabor y de las señales viscerales asociadas con la ingesta de comida (Braun, 1990; Swards y Swards; 2001).



**Figura 16.** Esquema representativo de una sección transversal cerebral, donde se aprecian las distintas capas celulares que componen la Corteza Insular: la zona en color rosa se corresponde con la Corteza Insular Agranular Dorsal (AID) y Ventral (AIV), el área coloreada azul constituye la Corteza Insular Disgranular (DI) y la región en color amarillo representa la Corteza Insular Granular (GI) (adaptado de Paxinos y Watson, 1996).

Además de esta subdivisión de tipo citoarquitectónica, la mayoría de los autores coincide en una diferenciación anatómica y funcional de dos grandes territorios en el Córtez Insular: el Córtez Insular Anterior y el Córtez Insular Posterior.

#### **4.1. Córtex Insular Anterior.**

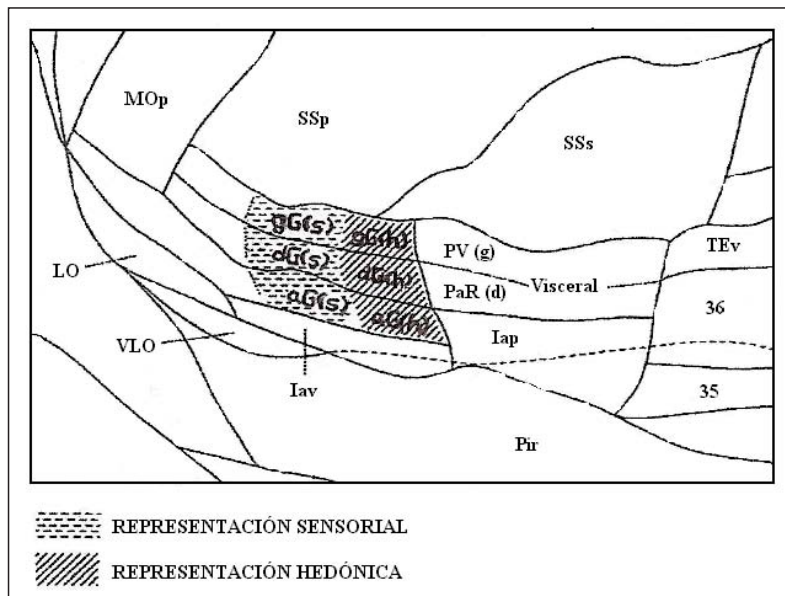
Esta región constituye los tres quintos anteriores de la Ínsula en la rata. Principalmente se ha relacionado con funciones de tipo gustativas y viscerales sensoriales. A su vez, y atendiendo a su organización citoarquitectónica, el Córtex Insular Anterior consta de tres áreas que según su localización dorso-ventral serían (ver Figura 15): **1.** El Córtex Insular Anterior **Granular**. En esta región se han identificado las neuronas que responden a la estimulación térmica de la lengua, y a nivel más dorsal se localizaría el Área Somatosensorial Primaria donde se encuentran las neuronas que responden a la estimulación táctil de la lengua (Kosar et al., 1986a; Ogawa et al., 1990). **2.** El Córtex Insular Anterior **Disgranular**, que es considerado por algunos autores como el córtex gustativo primario de la rata (Kosar et al., 1986a; Cechetto y Saper, 1987; Nakashima et al., 2000), donde se han identificado neuronas relacionadas con el gusto y con la estimulación térmica de la lengua (Kosar et al., 1986a; Cechetto y Saper, 1987; Ogawa et al., 1990; Hanamori et al., 1998). **3.** Y la parte anterior del Córtex Insular **Agranular**, en la que se pueden diferenciar la Corteza Insular Agranular Dorsal (IAd) (ventral al Cortex Insular Disgranular Anterior) y la Ventral (IAv), que estarían implicadas en funciones viscerales sensoriales y motoras (McDonald, 1998). Algunos autores consideran que estas áreas más rostrales de la Ínsula Agranular (“Región Insular Prefrontal”), que se extenderían hacia el interior del lóbulo frontal, formarían parte del Córtex Prefrontal Lateral (McDonald, 1998).

No obstante, dentro dentro del Área Cortical Insular Anterior, Hanamori y su grupo, han localizado unos grupos neuronales donde se da una convergencia de la información de tipo gustativo, visceral, olfatorio y nociceptivo (Hanamori et al., 1998). De acuerdo con estos datos, autores como Sowards afirman que el área de la Corteza Insular exclusivamente gustativa, contendría la representación sensorial del estímulo gustativo; el área en la que existe un solapamiento entre los estímulos viscerales y gustativos, estaría implicada en la representación hedónica del sabor y por último, la Corteza Insular Posterior a esta representación hedónica contendría la representación visceral (Sowards, 2004) (Ver Figura 17).

#### **4.2. Córtex Insular Posterior.**

Constituye los dos quintos posteriores de la Ínsula de la rata, y está principalmente involucrado en somestesis y en funciones vísceromotoras (Cechetto y Saper, 1987;

McDonald, 1998; Shi y Cassell, 1998; Zhang y Oppenheimer, 2000; Brooks et al., 2005). En efecto, estudios fisiológicos han confirmado que la estimulación eléctrica o química de esta región, origina respuestas cardiovasculares y respiratorias, así como cambios en la motilidad gástrica (Butcher y Cechetto, 1995; Zhang y Oppenheimer, 1997; McDonald, 1998; Bagaev y Aleksandrov, 2006). Concretamente, la estimulación eléctrica o química de la porción rostral del Córtex Insular Posterior elicitaría hipertensión y taquicardia, por lo que algunos autores lo denominan “lugar de presión”; mientras que la estimulación de la porción caudal o también denominado “zona de depresión” estaría implicada principalmente en el descenso de la frecuencia cardiaca y de la presión arterial (Butcher y Cechetto, 1995; Zhang y Oppenheimer, 1997).



**Figura 17.** Representaciones hedónica y sensorial de las áreas gustativas del Córtex Insular Anterior Granular, Disgranular y Agranular en la ratona. Abreviaturas: aG(h), representación hedónica en el Área Insular Agranular Gustativa; aG(s), representación sensorial en el Área Agranular; gG(h), representación hedónica en el Área Gustativa Insular Granular; gG(s), representación sensorial en el Área Granular; dG(h), representación hedónica en el Área Gustativa Insular Disgranular; dG(s), representación sensorial en el Área Disgranular; Iap, Córtex Insular Agranular Posterior; Iav, Córtex Insular Agranular Ventral; LO, Área Lateral Orbital; MOP, Área Motora Primaria; PaR (d), Corteza Insular Parietal Rhinal (disgranular); Pir, Córtex Piriforme; PV (g), Corteza Insular Parietal ventral (granular); SSp, Área Somatosensorial Primaria; SSs, Área Somatosensorial Secundaria; TEv, Área Temporal ventral; VLO, Área Orbital Ventrolateral. (Adaptado y modificado de Sowards, 2004).

En el Cortex Insular Posterior se pueden diferenciar nuevamente tres sustratos, que en una dimensión dorsoventral serían: **1. Área Parietal Ventral (PV)**; **2. Área Parietal Rinal (PaR)**; y **3. La parte caudal de la Ínsula Agranular Posterior (IAp)** (Shi y Cassell, 1998) (ver Figura 17).

Las Áreas Parietal Ventral (PV) y Rinal (PaR) son las regiones Granulares y Disgranulares, respectivamente, de la Ínsula Posterior. Esas regiones (PV y PaR) mantienen conexiones con la Corteza Somatosensorial Primaria y Secundaria, y con el Tálamo Somatosensorial (Shi y Cassell, 1998b). En la PaR se han identificado neuronas que responden a la estimulación sensorial visceral general (Cechetto y Saper, 1987), por lo que algunos autores la han denominado “Corteza Insular Disgranular Visceral” (McDonald, 1998). Por otra parte, también se han observado respuestas sensoriales viscerales en el Área Parietal Ventral (Cechetto y Saper, 1987).

La Ínsula Agranular Posterior (IAp) se localiza ventralmente a las porciones disgranulares anterior y posterior (Córtex Insular Disgranular Anterior y PaR, respectivamente) y recibe información somatosensorial, olfatoria, gustativa y visceral, por lo que es considerada como un área cortical polisensorial (McDonald, 1998; Shi y Cassell, 1998; Sowards y Sowards, 2001).

### **4.3. CONEXIONES ANATÓMICAS DE LA CORTEZA INSULAR.**

#### **4.3.1. AFERENCIAS DE LA CORTEZA INSULAR.**

Un análisis anatómico de las aferencias talámicas que recibe la Corteza Insular confirma la existencia de una división funcional de esta estructura en dos grandes áreas, la Ínsula Anterior y la Posterior (McDonald, 1998; Shi y Cassell, 1998). La división anterior, que ha sido relacionada con funciones víscero-gustativas, recibe fibras procedentes del Tálamo sensorial visceral, concretamente del Núcleo Centromediano (CM) y de la parte medial del Núcleo Ventro-posterior Parvicelular (VPpc). Estas fibras proyectan al Córtex Insular Disgranular y Granular Anterior, extendiéndose también a la parte dorsal del Córtex Agranular (Nakashima et al., 2000). Por su parte la región Posterior, implicada en el

procesamiento de la información visceral general y somatosensorial, mantiene conexiones con el Núcleo Suprageniculado, la división Interna del Genuculado Medial y la parte Lateral Medial del Núcleo Ventroposterior Lateral Parvicelular (VPLpc) así como con Núcleos Talámicos Somatosensoriales como el Posterior, el Ventral Posterior y los Núcleos Centrolaterales (Kosar et al, 1986a; Cechetto y Saper, 1987; Clascá et al., 1997; McDonald, 1998; Flynn et al., 1999; De Lacalle y Saper, 2000; Nakashima et al., 2000; Barnabi y Cechetto, 2001; Desbois y Villanueva, 2001; Zhang y Oppenheimer, 2000).

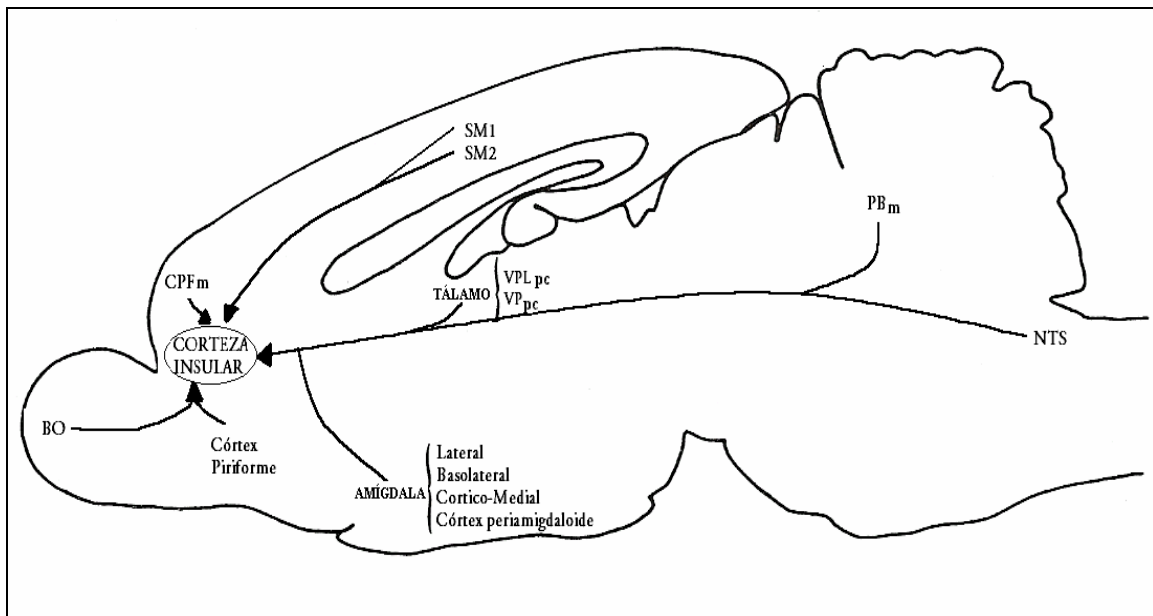
Por último, las áreas insulares mas rostrales como la Ínsula Agranular Dorsal y la Ventral (AId y AIv respectivamente) mantienen conexiones con el Núcleo Dorsomedial del Tálamo (Saper, 1995, 2004; Nègyessy et al., 1998).

Recientemente, se ha descrito otro grupo de neuronas que forman un continuo en la parte posterior del Complejo Talámico Intralaminar, que inervan el Córtex Insular Disgranular y otras estructuras como el Córtex Perirhinal, la Amígdala y la parte ventral del Estriado (De Lacalle y Saper, 2000).

La información visceral que llega a la CI es transmitida secuencialmente desde el NTS al NPB y posteriormente al Tálamo Vento-posterior, aunque se ha descrito también alguna conexión directa desde los dos tercios más caudales del NPBm hasta los estratos Agranular y Granular de la Corteza Insular Anterior y Posterior (Saper y Loewy, 1980; Fulwiler y Saper, 1984; Yasui et al., 1985; Cechetto y Saper, 1987; Ito, 1992; Zhang y Oppenheimer, 2000). Así, mediante técnicas neurofisiológicas se ha comprobado que tras la activación experimental cervical vagal, existe una coactivación de células vagales del NTS y del Área Insular Anterior (parte Dorsal de la Corteza Insular Granular) (Ito, 1998; Barnabi y Cechetto, 2001).

Aunque el NTS y el NPB probablemente transfieran su información vagal al CI, resultados recientes sugieren que estas proyecciones (NPB) directas podrían actuar como moduladoras de la información visceral aferente hacia centros cerebrales superiores (Barnabi y Cechetto, 2001). Estos autores han demostrado que el bloqueo de las sinapsis eferentes del Núcleo Vento-posterior Parvicelular del Tálamo mediante iones cobalto, bloquea por completo la actividad neuronal de la Corteza Insular provocada por estimulación vagal (Barnabi y Cechetto, 2001).

Asimismo, se ha demostrado que la porción más anterior de la Ínsula Agranular (Ínsula Agranular Dorsal y Ventral) y la Ínsula Agranular Posterior, recibe proyecciones directas desde el Bulbo Olfatorio Principal y conexiones adicionales desde el Córtex Piriforme (Córtex Olfatorio Primario) y el Núcleo Endopiriforme (Datiche y Cattarelli, 1996; Behan y Haberly, 1999) (ver Figura 18). Además de estas proyecciones olfatorias, esta región recibe proyecciones desde la CI Granular y en mayor medida desde la CI Disgranular Anterior (Shi y Cassell, 1998; Swards y Swards, 2001), así como del relevo gustativo talámico y del Complejo Parabraquial (Nakashima et al., 2000; Swards y Swards, 2001). Esta convergencia de información gustativa, olfatoria y visceral sensorial indica que esta zona de la CI podría jugar un papel fundamental en la integración de la información sobre la sensación visceral y gustativa así como en la información límbica o motivacional (Swards y Swards, 2001).



**Figura 18.** Esquema representativo de las principales conexiones anatómicas aferentes que recibe la Corteza Insular de distintas estructuras cerebrales. Abreviaturas: BO, Bulbo Olfatorio principal; CPFm, Córtex Prefrontal Medial; NTS, Núcleo del Tracto Solitario; PBm, Núcleo Parabraquial Medial; SM1, SM2, Córtex Somatosensorial Primario y Secundario, respectivamente; VPLpc, Núcleo Ventroposterior Lateral parvicelular del Tálamo; VPpc, Núcleo Ventroposterior Parvicelular del Tálamo.

Por otra parte, con técnicas de trazado anterógrado se ha podido comprobar que el Área Parietal ventral (PV) de la Corteza Insular posterior mantiene conexiones con el Área Somatosensorial Primaria (concretamente con la parte anteroventral, dorsomedial y la porción caudal de ésta), así como con la Corteza Somatosensorial Secundaria. Por su parte, la Corteza Insular Parietal rinal (PaR) recibe aferencias de las Áreas Somatosensoriales Primaria (porción ventral) y Secundaria. Asimismo, se han descrito proyecciones desde esta región (PaR) y la adyacente Ínsula Agranular Posterior, hacia la porción dorsal del Córtex Perirhinal, región que desempeña un papel importante en el procesamiento de la información somatosensorial (McDonald, 1998; Shi y Cassell, 1998b; Sowards y Sowards, 2001).

Así pues la información somatosensorial que ha sido procesada a nivel cortical, es transmitida inicialmente a través de Áreas Somatosensoriales Secundarias del lóbulo parietal y posteriormente, a través de la Ínsula Posterior, la cual mantiene conexiones recíprocas con la Amígdala (McDonald, 1998). Los diferentes subnúcleos de la Amígdala (áreas Basolateral, Corticomedia) así como del Córtex Periamigdalóide proyectan hacia la CI Agranular Ventral, mientras que las Áreas Agranular Dorsal y Granular o Disgranular de la Corteza Insular Anterior, reciben aferencias de la Amígdala Lateral y Basolateral (Yamamoto et al., 1981; Lasiter, 1982; Lasiter y Glanzman, 1982; 1985; Yamamoto et al. 1984; McDonald y Jackson, 1987). También se ha comprobado que el Núcleo Talámico Intermediodorsal y el Núcleo Amigdalóide Basal Magnocelular (estructuras que a su vez están conectadas con la porción lateral del NAcc y el Caudado Putamen) están conectadas con la Corteza Insular Disgranular (Wright y Groenewegen, 1996).

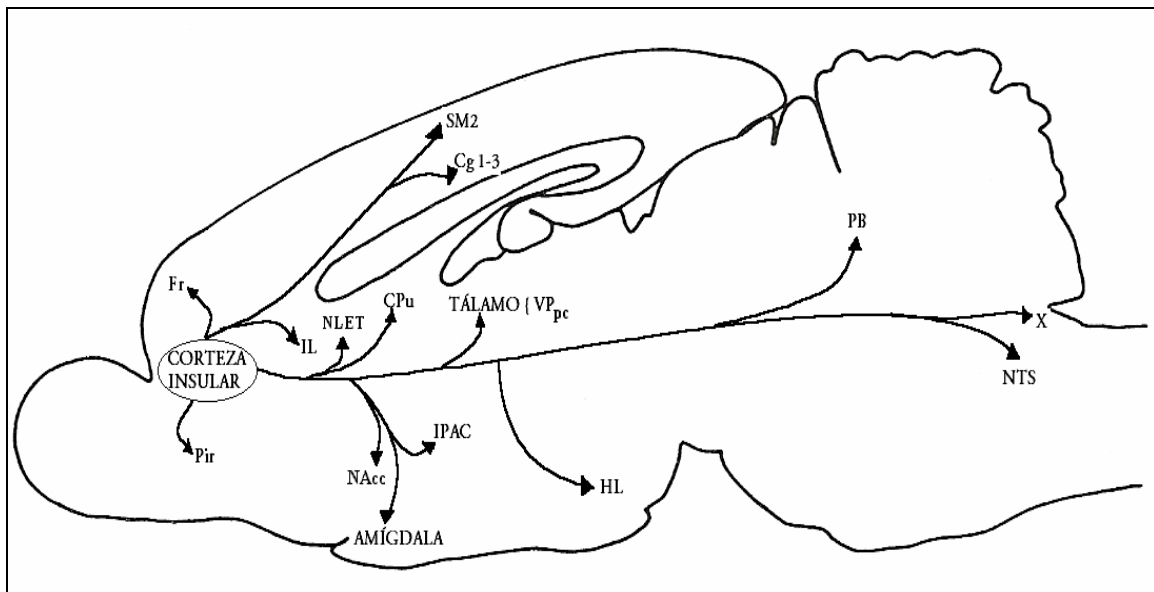
Por último, se han descrito conexiones recíprocas entre las Áreas 32 y 25 (implicadas en funciones cognitivas y vísceromotoras, respectivamente) del Córtex Prefrontal Medial y la Corteza Insular Posterior y Agranular Dorsal Anterior (Gabbott et al., 2003) (ver Figura 18).

#### **4.3.2. AFERENCIAS DE LA CORTEZA INSULAR.**

Se han descrito conexiones recíprocas con la mayor parte de estructuras troncoencefálicas que proyectan hacia la CI (ver Figura 19). Concretamente, existe una vía directa entre la CI y el Complejo Dorsal Vagal (DVC). Este último incluye el NTS y el

Núcleo Dorsomotor del Vago (que contiene neuronas preganglionares gástricas) (Aleksandrov et al., 1996; Bagaev y Aleksandrov, 2006). Los núcleos dorsomedial y VPpc del Tálamo también están interconectados con la CI (Aleksandrov et al., 1996; Nègyessy et al., 1998; Shi y Cassell, 1998; King et al., 1999; Nakashima et al., 2000). Más concretamente, la Ínsula Agranular mantiene conexiones con los Núcleos Talámicos Dorsomedial, Ventromedial, Parafascicular y los Núcleos Mediales. La Ínsula Disgranular conecta con la porción gustativa y viscerosensorial del Tálamo Ventro-Posterior y el Núcleo Ventro-Lateral. Y la Ínsula Granular proyecta hacia los núcleos Posterior Ventral Inferior (VPI) y Posteromedial del Tálamo (Flynn et al., 1999).

Asimismo se han descrito eferencias desde la Ínsula hacia los Núcleos Dorsal y Central Superior del Rafe, al Área Tegmental Ventral (ATV), a la Sustancia Gris Periacueductal, al Lucus Coeruleus y al Núcleo Reticular Parvocelular (para una revisión ver Flynn et al., 1999).



**Figura 19.** Esquema representativo de las principales conexiones anatómicas eferentes que mantiene la Corteza Insular con distintas estructuras cerebrales. Abreviaturas: Cg, Córtex Cingulado; CPu, Caudado Putamen; Fr, Córtex Frontal; HL, Hipotálamo Lateral; IL, Córtex Infralímbico; IPAC, Núcleo Intersticial del Miembro de la Comisura Anterior; NAcc, Núcleo Accumbens; NTS, Núcleo del Tracto Solitario; NLET, Núcleo Lecho de la Estría Terminal; PB, Núcleo Parabraquial; Pir, Córtex Piriforme; SM2, Córtex Somatosensorial Secundario; VPpc, Núcleo Ventro-Posterior Parvicelular del Tálamo; X, Décimo Par Craneal (Vago).

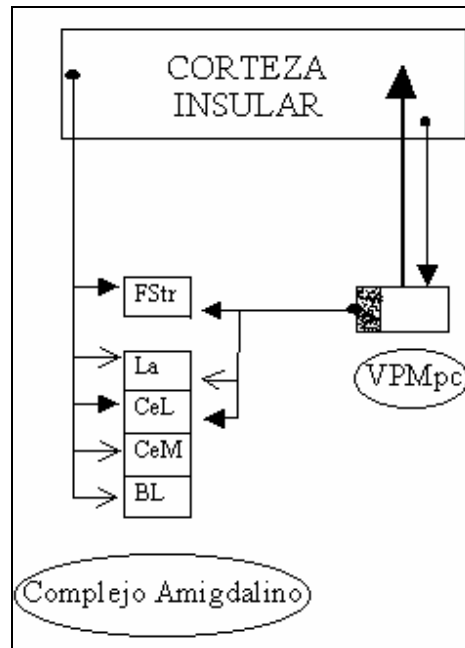


Las proyecciones descendentes de la CI se originan fundamentalmente en la zona Agranular y se dirigen hacia el Hipotálamo Lateral Posterior (HL) (Butcher y Ceccheto, 1998; Öngür y Price, 1998), la parte caudal y rostral del NTS (Flynn et al., 1999; Hayama y Ogawa, 2001), al Núcleo Intersticial del Miembro (“limb”) de la Comisura Anterior (IPAC) o “Fundus Striati” (Nakashima et al., 2000; Otake y Nakamura, 2003), al Complejo Parabraquial (Moga et al., 1990; Flynn et al., 1999), al Tálamo gustativo (Nakashima et al., 2000) y al Córtex Perirhinal (Moga et al., 1990; Saper, 1995, 2004; Flynn et al., 1999; Sowards y Sowards, 2001). Aunque también se han descrito proyecciones, más débiles, desde la Corteza Insular Disgranular hacia el Córtex Perirhinal (Sowards y Sowards, 2001).

Por otra parte, también se han descrito proyecciones desde la CI al Núcleo Lentiforme (Flynn et al. 1999), al Núcleo Caudado Putamen Ventral y Dorsoventral (Wright y Groenenwegen, 1996; Nakashima et al., 2000; Reynolds y Zahm, 2005) y a la cola del Núcleo Caudado (Flynn et al., 1999).

También existen conexiones directas entre la Corteza Insular y el Núcleo Accumbens (NAcc) (Fenu et al., 2001; Kelley et al., 2002; Reynolds y Zahm, 2005). Concretamente, entre la Cápsula del NAcc y la región medial de la Corteza Insular; y la región Nuclear del NAcc y la Corteza Insular Agranular Posterior (Reynolds y Zahm, 2005). Algunos autores consideran que la información que la Cápsula del NAcc recibe desde la CI Agranular (también desde la Amígdala Basolateral y Central), actúa modulando el control que esta estructura ejerce sobre regiones como el NPB y el NTS, posible mecanismo a través del cual el trazo de memoria del estímulo gustativo quedaría disponible para ser asociado con las consecuencias metabólicas que se derivan de su consumo, independientemente de su valencia (Fenu et al., 2001).

La Corteza Insular también mantiene conexiones directas con el Núcleo Lecho de la Estría Terminal y la Amígdala (Yamamoto et al., 1984; Lasiter y Glanzman, 1985; Escobar et al., 1989; Nakashima et al., 2000; Reynolds y Zahm, 2005) (ver Figura 20). Así, se han descrito proyecciones hacia los Núcleos Amígdalinos Centrales y Laterales, (Yamamoto et al., 1984; McDonald y Jackson, 1987; Augustine, 1996; McDonald, 1998; Shi y Cassell, 1998b; Nakashima et al., 2000; Reynolds y Zahm, 2005).



**Figura 20.** Representación esquemática de las conexiones entre la Corteza Insular y el Tálamo Posterior Ventral Medial (VPMpc) y el Complejo Amigdalino. El VPMpc mantiene conexiones recíprocas con la Corteza Insular. La CI envía proyecciones al Fundus Striati (FStr), a los Núcleos Lateral Central (CeL) y Lateral de la Amígdala (La), y la parte medial del Núcleo Central de la Amígdala (CeM). El Fundus Striati, el Núcleo Lateral y el Lateral Central de la Amígdala también reciben proyecciones desde la parte medial del Tálamo VPMpc. (Adaptado de Nakashima et al., 2000).

Por último, señalar que una mayoría de las aferencias viscerales que llegan al CI terminan en las Áreas Granular y Disgranular, mientras que el Área Agranular es la región de donde proceden predominantemente las proyecciones eferentes hasta estructuras autonómicas (Aleksandrov et al., 1996; Bagaev y Aleksandrov, 2006). Este hecho sugiere que además de otras conexiones intracorticales (ver Figura 19) (Augustine, 1996; Shi y Cassell, 1998b; Flynn et al. 1999; Gabbott et al., 2003; Santiago y Shammah-Lagnado, 2005), existen múltiples interconexiones entre los distintos componentes de la Corteza Insular. Según las conexiones de la CI y diferentes estructuras cerebrales, Shi y Cassell (1998b) sugieren que la Ínsula Anterior podría ser la interfaz entre la CI Posterior y el Córtex Motor, mientras que sus conexiones con las regiones de la Amígdala estarían relacionadas con funciones motoras.

#### **4.4. SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN LOCALIZADOS EN LA CORTEZA INSULAR E IMPLICACIONES FUNCIONALES.**

Dadas las numerosas interconexiones que mantiene la Corteza Insular tanto a nivel cortical como subcortical, parece lógico pensar que en esta región están presentes un buen número de sistemas de neurotransmisión, tanto excitatorios como inhibitorios.

Entre estos se encuentran los sistemas glutamérgico y colinérgico. Distintos estudios han demostrado un incremento en la liberación de **acetilcolina** en la Corteza Insular, cuando se produce el procesamiento de estímulos gustativos novedosos (Naor y Dudai, 1996; Berman et al., 2000; Miranda et al., 2000). Aunque algunos autores consideran que este aumento en la liberación de acetilcolina podría estar relacionado con la expresión conductual hedónica generada por los estímulos gustativos aversivos (Shimura et al., 1995).

Asimismo, el consumo de estímulos gustativos nuevos, activa señales mediadas específicamente por el sistema glutamérgico además del colinérgico (Berman et al., 2000; Miranda et al., 2003). Además de los neurotransmisores señalados se considera que el sistema dopaminérgico (D1/D5) y los receptores GABA A, son necesarios para la formación del sabor, aunque sólo los sistemas ácido glutámico/AMPA y GABA son necesarios para el recuerdo de dicha información (Berman et al., 2000; Miranda et al., 2003).

Otras sustancias relacionadas con la ingesta que también están presentes en la CI son el Neuropeptido Y (receptor Y1) (Migita et al., 2001), y un moderado número de fibras de neuronas que contienen orexinas A y B que proyectan desde el Hipotálamo Lateral y Posterior hasta la Corteza Insular (Date et al., 1999).

La transmisión de la información visceral desde el Tálamo Ventro-posterior Parvicelular (VPpc) hacia la Corteza Insular se produciría a través de receptores de aminoácidos excitatorios no-NMDA, probablemente del receptor kainato (Barnabi y Cechetto, 2001).

Se ha demostrado la presencia del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub> en esta región cortical (Palchadhuri y Flügge, 2005), y así se ha comprobado que el uso crónico de cocaína en humanos produce un aumento significativo en el transportador de la serotonina en distintas áreas cerebrales entre las que se encuentra el Giro Orbitofrontal, el Giro Cingulado y la Corteza Insular Anterior (Mash et al., 2000). En este sentido, mediante técnicas de neuroimagen (resonancia magnética, RMI) se ha demostrado que el consumo crónico de cocaína provoca un descenso significativo en la concentración de materia gris en el Córtex Insular Anteroventral, Córtex Orbitofrontal Ventromedial, Córtex Cingulado Anterior y Córtex Temporal Superior (Franklin et al., 2002).

Con respecto a la CI posterior, se ha propuesto que el neurotransmisor más implicado en las funciones autonómicas en las que esta estructura está implicada, es la **noradrenalina**, cuya acción estaría principalmente mediada por la estimulación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. A su vez, la influencia  $\beta$ -adrenérgica sobre la respuesta autonómica estaría modulada por la estimulación de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> localizados en la CI Agranular (Funk y Stewart, 1996).

En efecto, distintas investigaciones conductuales e inmuno-histoquímicas muestran la presencia de este neurotransmisor así como de receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> en la Corteza Insular, principalmente en la CI Agranular (Jones et al., 1986; Zito et al., 1988; Burkey et al., 1999; Hurd et al., 2001). Mediante diferentes estudios conductuales se ha demostrado que la liberación de dopamina endógena en la CI Agranular rostral podría estar implicada en algunos de los efectos inducidos por la administración de morfina, concretamente en el efecto analgésico y en la adquisición de aversiones gustativas inducidas por dicha sustancia (Zito et al., 1988; Burkey et al., 1999).

De hecho, se han identificado también una gran cantidad de neuropéptidos y particularmente **opiáceos** endógenos en la Corteza Insular (Mansour et al., 1994; García et al., 1995; Burkey et al., 1996; Izenwasser et al., 1999). Concretamente en la zona disgranular, aunque también en los cuerpos neuronales de la zona agranular se ha detectado una elevada concentración de receptores opiáceos  $\kappa$  (Burkey et al., 1996; Izenwasser et al., 1999). Estos receptores han sido relacionados con equilibrio hídrico, nutrición, percepción del dolor y control neuroendocrino (Mansour et al., 1988; Mansour et al., 1994; Akil et al., 1997).

Igualmente se ha puesto de manifiesto una alta densidad de receptores de opiáceos  $\mu$  en la CI Agranular, fundamentalmente localizados en las arborizaciones dendríticas de las neuronas de esta zona (Mansour et al., 1994; García et al., 1995; Burkey et al., 1996). Algunos autores han relacionado el efecto analgésico inducido por la morfina, con la actuación de esta sustancia sobre dichos receptores (Burkey et al., 1999).

En este sentido diversos autores han puesto de manifiesto la amplia distribución de receptores  $\delta$  en la Ínsula (Svingos et al., 1995), con una localización postsináptica. También se ha descrito una localización presináptica, modulando así la liberación de transmisores de carácter inhibitorio (como la dopamina y GABA) y posiblemente del ligando opiáceo endógeno Met-enkefalina (ENK). Estos receptores han sido localizados en regiones dendríticas así como en las terminales axónicas, lo que sugiere que pueden funcionar como aurreceptores (Svingos et al., 1995).

Finalmente y también en relación con el sistema de opiáceos, se ha puesto de manifiesto una marcada presencia de orfanina estimulada por GTP $\gamma$ S (agonista estimulador de Pre-Pro-Orfanina) y del receptor de opiáceos endógenos ORL<sub>1</sub>, en la Corteza Insular Granular y Agranular (Neal et al., 1999; 2003). Esta sustancia parece estar implicada en la modulación de funciones tales como el control cardiovascular, el balance hídrico, la nocicepción, la ingesta, el aprendizaje, la locomoción, las respuestas de estrés o la conducta sexual.

## **5. HIPÓTESIS DE TRABAJO.**

Como se ha puesto de manifiesto a lo largo de la Introducción de esta Tesis Doctoral, numerosas investigaciones previas sugieren que el sustrato neurobiológico que sustenta el refuerzo natural, podría coincidir de alguna manera con el implicado en el procesamiento de las señales reforzantes artificiales (Wise y Rompre, 1989; Wise, 1996; 2002; Nader et al., 1997;; Kelley y Berridge, 2002; Kelley, 2004). Sin embargo y con respecto a estas últimas, la estimulación eléctrica intracerebral, por ejemplo, puede provocar efectos de carácter aversivo y reforzante (Anderson et al., 1995; Diotte et al., 2000), lo cual sugiere una interrelación también entre los sistemas neurales implicados en el procesamiento de los aspectos motivacionales apetitivos y aversivos (Hoebel, 1976; Salamone, 1994; Brandão et al., 1999; Robbins y Everitt, 1999; O'Doherty et al., 2001). Por tanto, es posible que el sustrato neuroanatómico implicado en el refuerzo también podría coincidir en determinadas áreas cerebrales con la información visceral aversiva (Carr y Wolinsky, 1993; Carr, 1996; Carr et al., 2000).

En este sentido, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio han definido dos ejes víscero-cerebrales distintos tanto a nivel anatómico como funcional que constituyen vías independientes para el procesamiento tanto de los estímulos aversivos y como de los reforzantes de origen visceral (Arnedo et al., 1990; 1993; Gallo et al., 1990; 1991; Agüero et al., 1993a, b; 1997; Cubero et al., 2001; Mediavilla, 1995; Mediavilla et al., 1999; 2000; Cubero y Puerto, 2000; Zafra et al., 2002; Simón, 2003). Uno de estos ejes es el constituido por el nervio Vago-Núcleo del Tracto Solitario-Núcleo Parabraquial Medial y Lateral Externo (Fulwiler y Saper, 1984; Yuan y Barber, 1991; Agüero et al., 1997; Mediavilla et al., 2000; Zafra et al., 2002; Simón, 2003) que estaría implicado en aprendizajes concurrentes o a corto plazo. El otro sistema incluiría al Área Postrema-Núcleo Parabraquial Lateral, que transmitiría información visceral por vía humoral y estaría relacionado con el aprendizaje secuencial o a largo plazo (Ritter et al., 1980; Gallo et al., 1988, 1991; Cubero, 1995; Cubero y Puerto, 2000).

Uno de los principales relevos en la transmisión de la información viscerosensorial hacia estructuras rostrales es el Complejo Parabraquial (Fulwiler y Saper, 1984; Herbert et al., 1990; Moga et al., 1990; Halsell, 1992; Kobashi et al., 1993; Krukoff et al., 1993; 1994; Saleh y Cechetto, 1993; Saper, 1995b; De Lacalle y Saper, 2000; Krout y Loewi, 2000; Karimnamazi et al., 2002). Dentro de esta estructura, el Núcleo Parabraquial Lateral Externo desempeña un importante papel en el procesamiento de la información aversiva y/o relacionada con el dolor (Bernard et al., 1991; 1994; 1995; Light et al., 1993; Bester et al., 1995; 1997; Saper, 1995a; Jasmin et al., 1997; Craig y Dostrovsky, 1999), o en el aprendizaje aversivo gustativo (Yamamoto et al., 1992; Yamamoto et al., 1994; Sakai y Yamamoto, 1997; Mediavilla et al., 2000) así como en el procesamiento de la información relacionada con los aspectos hedónicos y motivacionales de la comida (Reilly et al., 1993; Li et al., 1994; Ritter, 1994; Yamamoto et al., 1994; Monroe y Di Lorenzo 1995; Hoebel, 1997; Horn y Friedman, 1998; Wang et al., 1999; Reilly y Trifunovic, 2000a, b; Yamamoto y Sawa, 2000a, b). Lesiones de este subnúcleo interrumpen la adquisición del aprendizaje aversivo concurrente (Mediavilla et al., 2000) así como la adquisición de preferencias de tipo gustativo inducidas por la administración intragástrica de nutrientes predigeridos también mediante tareas de aprendizaje concurrente (Zafra et al., 2002); sin influir en las tareas de aprendizaje de tipo secuencial.

Relacionado con el Área Parabraquial se encuentra la Corteza Insular, estructura que recibe convergencia de información visceral y sensorial (Cechetto y Saper, 1987; Ogawa et al., 1990; Augustine, 1996; King et al., 1999; Zhang y Oppenheimer, 2000) y que en efecto, que recibe aferencias viscerales vagas desde el NTS y NPB Medial y Lateral (Saper y Loewy, 1980; Fulwiler y Saper, 1984; Yasui et al., 1985; Cechetto y Saper, 1987; Ito, 1992; Zhang y Oppenheimer, 2000). La Corteza Insular también ha sido relacionada con el procesamiento de información reforzante y aversiva. Así, esta región ha sido implicada en el aprendizaje aversivo gustativo (AAG), tanto en su adquisición como en su retención (Cechetto y Saper, 1987; Yamamoto et al., 1989; Cubero, 1995; Bures et al., 1998; Sakai y Yamamoto, 1999; Escobar y Bermudez-Rattoni, 2000...), así como en la inducción de preferencias comportamentales (Cubero et al., 1999).

La participación de la Corteza Insular en los procesos comportamentales reforzantes también ha sido demostrada. Así, este área ha sido relacionada con la valoración hedónica innata o aprendida de los estímulos gustativos (Yamamoto et al., 1989; Kiefer y Orr, 1992; Phillips et al., 1997; Bures et al., 1998; Cubero y Puerto, 2000); o con el proceso de

aprendizaje acerca del valor recompensante de los alimentos (De Couteau et al., 1997; Balleine y Dickinson 1998; 2000; Beninger y Miller, 1998; Ragozzino y Kesner, 1999). En este sentido y utilizando pruebas de aprendizaje instrumental, lesiones de la CI Agranular deterioran el recuerdo de la magnitud del valor reforzante de la comida (De Couteau et al., 1997; Balleine y Dickinson 1998; 2000; Ragozzino y Kesner, 1999), pero no la localización espacial del refuerzo (Ragozzino y Kesner, 1999).

De acuerdo con estos resultados mientras las lesiones de estas estructuras provocan grandes déficits en el establecimiento de asociaciones víscero-sensoriales cabría plantearse si la activación del NPB Lateral y de la CI, mediante estimulación eléctrica intracerebral, resultaría un procedimiento adecuado para inducir conductas recompensantes. En efecto, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio ofrecen pruebas a favor de este planteamiento. Por ejemplo, la estimulación eléctrica del NPBl induce una clara preferencia por los estímulos gustativos asociados a la estimulación, en una tarea de discriminación gustativa (Simón et al., 2007). El mismo resultado se obtiene tras la estimulación eléctrica de la CI en una tarea de aprendizaje discriminativo gustativo de tipo demorado (Cubero y Puerto, 2000).

Un primer objetivo planteado en esta Tesis ha sido el análisis funcional de las características del refuerzo y la aversión inducidas mediante la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular Posterior y del Núcleo Parabraquial Lateral Externo, y en particular la especificidad estimular del proceso adquisitivo. A través de distintos procedimientos conductuales, tareas de discriminación gustativas y espaciales (condicionamiento de preferencia por un lugar), se ha examinado si el refuerzo obtenido estaba asociado al sistema gustativo, o si, por el contrario, era universal, no circunscrito a una sola modalidad sensorial.

Asimismo se ha estudiado la relevancia de cada una de estas dos estructuras en las distintas modalidades de aprendizaje: concurrente/ implícito y secuencial/ explícito. Para ello se han empleado pruebas en contigüidad/ corto plazo y demoradas/ largo plazo en tareas de inducción de preferencias gustativas o por un lugar. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio mediante estudios de aprendizaje gustativo (aprendizaje aversivo gustativo y aprendizaje de preferencias gustativas), apuntaban a que el NPBl está implicado en el aprendizaje de tipo concurrente (Mediavilla et al., 2000; Zafra et al., 2002; Simón, 2003), ahora se examina si la activación eléctrica de este núcleo puede inducir



preferencias en tareas de discriminación gustativa secuenciales. Por lo que se refiere a la CI Agranular Posterior, se ha comprobado si además de participar en aprendizajes secuenciales (Cubero y Puerto, 2000), esta estructura es relevante en el establecimiento de asociaciones inter-estimulares sin demora.

Por último, en esta Tesis Doctoral se lleva a cabo un análisis farmacológico de los mecanismos implicados en la inducción de preferencias mediante estimulación eléctrica. Aunque los sistemas neuroquímicos implicados en el refuerzo son muy diversos (De Vries y Shippenberg, 2002), el sistema de opiáceos ha sido probablemente el más relacionado con el refuerzo y la nutrición (Apfelbaum y Mandenoff, 1981; Drewnowski et al., 1992; Le Magnen, 1992; 1999; Carr y Papadouka, 1994; Papadouka y Carr, 1994; Hoebel, 1997), y se han identificado una abundancia de receptores opiáceos tanto en el Núcleo Parabraquial (Mansour et al., 1988; 1994; Wolinsky et al., 1994) como en el Córtex Insular (Mansour et al., 1988; 1994; Wolinsky et al., 1994; García et al., 1995; Svingos et al., 1995; Burkey et al., 1996; Izenwasser et al., 1999; Paredes et al., 2000; Vilpoux et al., 2002). Para analizar su participación en el refuerzo obtenido por la estimulación eléctrica de estas áreas, se ha comprobado si un antagonista opiáceo como la Naloxona podría bloquear el efecto recompensante. En este contexto, también se analiza si se produce un efecto sensibilizador tras la administración repetida de la estimulación eléctrica en la CI Posterior, cuantificado a través del registro de la actividad locomotora de los animales.

Esta serie experimental pretende dar un paso más en el estudio de los centros cerebrales implicados en el refuerzo y en el aprendizaje víscero-cerebral, así como en el conocimiento de los mecanismos neurobiológicos y químicos que pueden modularlo. Dado que el sistema de refuerzo y el aversivo parecen discurrir en paralelo, interrelacionándose, esta Tesis ha incluido el estudio de ambos procesos motivacionales.

**ESTUDIOS  
EXPERIMENTALES**

---



**CAPÍTULO I: PREFERENCIAS POR UN LUGAR INDUCIDAS POR LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DEL NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL EXTERNO: EFECTO DE LA NALOXONA.**



## **EXPERIMENTO 1: Preferencias por un lugar inducidas por la estimulación eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo: Efecto de la Naloxona.**

---

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la participación del Complejo Parabraquial en distintas conductas motivadas (Grill y Kaplan, 1990; Le Magnen, 1992; Ritter et al., 1992b; Rowland et al., 1996). En esta área, el Núcleo Parabraquial Lateral Externo (PBLE), tal y como se describe en el capítulo de Introducción, se encuentra en el extremo dorsolateral del Complejo Parabraquial (Fulwiler y Saper, 1984; Herbert y Bellintani-Guardia, 1995). Esta estructura constituye un importante centro en la transmisión de la información viscerosensorial desde áreas como el NTS o el Área Postrema hacia otras estructuras (Papas y Ferguson, 1990; Halsell y Travers, 1997; De Lacalle y Saper, 2000; Karimnamazi et al., 2002).

Distintas investigaciones han analizado la naturaleza de la información que se procesa en este subnúcleo. Así, estudios llevados a cabo por una gran variedad de autores sugieren que la representación de las propiedades gustativas y viscerales, sobre todo de carácter negativo o aversivo, están representadas en el Núcleo Parabraquial Lateral Externo (Agüero et al., 1993a, b; Swank y Bernstein, 1994; Yamamoto et al., 1994; Sakai y Yamamoto, 1997, 1998; Reilly, 1999; Mediavilla et al., 2000a). Concretamente se ha demostrado que lesiones electrolíticas de la región Parabraquial Lateral Externa, interrumpen el aprendizaje interoceptivo concurrente (Mediavilla et al., 2000). Asimismo se ha observado activación (c-fos) de esta región tras la administración de distintas sustancias aversivas, todas ellas efectivas en la inducción del AAG, entre otras, la administración de tratamientos eméticos (radiaciones con rayos X, rotación corporal, administración intraperitoneal (i.p.) de cloruro de litio, sulfato de cobre o etil alcohol) o incluso tras la administración de drogas de abuso con un importante componente reforzante/ positivo (cocaína, morfina o metanfetamina) (Sakai y Yamamoto, 1997).

A través de estudios electrofisiológicos también se ha demostrado que algunos subnúcleos relacionados con el procesamiento de los aspectos afectivos del sabor reciben información tanto visceral como somatosensorial (Bernard et al., 1994; Bester et al., 1995). Así, Bernard y colaboradores comprobaron que la estimulación visceral nociva, inducida por una distensión colorrectal y/ o por la administración intraperitoneal de bradiquinina, activa neuronas localizadas en las subdivisiones interna (gustativa) y externa (visceral) del NPBe así como en el NPBme (Bernard et al., 1994). Estos resultados se ven apoyados por otros estudios que han demostrado la participación de este subnúcleo en el procesamiento de la información relacionada con el dolor (Bester et al., 1995; Saper, 1995b; Jasmin et al., 1997; Bernard y Bandler, 1998; Buritova et al., 1998; Engblom et al., 2000). En efecto, se ha podido comprobar que la transmisión de información nociceptiva tiene como relevo el NPBe, en su trayectoria hacia estructuras superiores relacionadas con el procesamiento de los aspectos emocionales del dolor (Bernard et al., 1991; 1994; 1995; Light et al., 1993; Bester et al., 1995; 1997; Saper, 1995; Jasmin et al., 1997; Bernard y Bandler, 1998; Craig y Dostrovsky, 1999).

Sin embargo el NPBe también recibe información de carácter reforzante/ positivo. Por ejemplo, diversos estudios han demostrado que la administración de sustancias, como glucosa o sacarosa intra-duodenales o gástricas, provocan la activación del NPBe (Wang et al., 1999; Yamamoto y Sawa, 2000b). Por el contrario, lesiones de esta región interrumpen las preferencias gustativas inducidas por la administración de sustancias nutritivas reforzantes (Reilly y Trifunovic, 2000 a, b; Zafra et al., 2002) o la sobre-ingesta de productos gustativos apetitosos que se produce tras la lesión del Área Postrema (Edwards y Ritter, 1989).

En este contexto, diversos autores han propuesto que el componente positivo/ hedónico de la ingesta puede estar mediado entre otras, por la acción de los opiáceos endógenos. Así, estos estudios han demostrado que la administración de antagonistas opiáceos reduce la preferencia que los animales muestran hacia soluciones de sacarina o sacarosa (Le Magnen et al., 1980; Le Magnen, 1992) sin alterar la valoración hedónica de sustancias aversivas como la quinina (Parker et al., 1992; Levine et al., 1995; Yamamoto et al., 1998). Por el contrario, la administración sistémica o intra ventricular de morfina, incrementa la ingesta y muestra un patrón de reactividad gustativa, típico de los animales, hedónicamente positivo (Test de Reactividad Gustativa) (Yamamoto et al., 1998). Por otra parte, la ingesta de nutrientes apetitosos activa la producción de opiáceos endógenos tanto en humanos (Drewnowski et al., 1992; Melchior et al., 1994) como en animales

(Apfelbaum y Mandenoff, 1981; Le Magnen, 1992). Por último, la restricción crónica de alimento modifica cuantitativamente el número de los niveles de receptores opiáceos (Wolinsky et al., 1994). En el caso del Área Parabraquial se produce un descenso de los receptores  $\mu$  en los núcleos PBle y PBme, así como un incremento de los receptores  $\kappa$  en el NPBe (Wolinsky et al., 1996).

En esta línea, estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado la relevancia del PBle en el aprendizaje de preferencias gustativas inducidas por la administración de alimentos reforzantes (Zafra et al., 2002) o por la estimulación eléctrica de esta región (Simón, 2003). La especificidad estimular exclusiva o universal, de estos procesos adquisitivos no ha sido examinada por el momento. En otras palabras, no se conoce si los efectos reforzantes descritos anteriormente, estaban asociados al sistema gustativo (los únicos estudios utilizados hasta ahora), o si, por el contrario, serían universales, no circunscritos a una modalidad sensorial, y generalizables a otros índices por ejemplo, exteroceptivos, espaciales, etc, que concurrentemente estén presentes en el momento de la estimulación reforzante.

De acuerdo con estos datos, el objetivo de este estudio ha consistido en examinar el efecto de la estimulación eléctrica del NPBe (en ausencia de estímulos gustativos) en tareas de condicionamiento de preferencia por un lugar (CPP) según la modalidad concurrente. Esta técnica está considerada como un procedimiento eficaz para determinar los efectos reforzantes/ positivos de distintas intervenciones intracerebrales (Mucha et al., 1982; Bardo et al., 1995; Schechter y Calcagnetti, 1998; Tzschentke, 1998; 2001; McBride et al., 1999; Spiteri et al., 2000). En esencia consiste en asociar un tratamiento de carácter aversivo o apetitivo a los índices sensoriales de una zona determinada de un laberinto, mientras que la administración de un estímulo neutro o la no administración del tratamiento es relacionada con los índices de una segunda zona del mismo laberinto. Tras varios ensayos de adquisición, al animal se le ofrece elegir entre las zonas del laberinto, contabilizando el tiempo de permanencia en cada uno de los compartimentos. La preferencia, huida o indiferencia por el lugar con el que fue asociado el tratamiento a examinar, es indicativa de la naturaleza reforzante/ positiva (agua, comida, estimulación eléctrica reforzante, drogas de abuso...) (Mucha et al., 1982; Bardo et al., 1995; Olmstead y Franklin, 1997; Schechter y Calcagnetti, 1998; Shippenberg y Elmer, 1998; Tzschentke, 1998; 2001; McBride et al., 1999; Spiteri et al., 2000) o aversiva (administración de agonistas  $\kappa$  opiáceos...) (Shippenberg y Elmer, 1998; McBride et al., 1999) del estímulo administrado.



Dado que, los opiáceos endógenos han sido implicados en el componente hedónico de sustancias/ procedimientos naturales (nutrición) (Le Magnen, 1992; Carr y Papadouka, 1994; Papadouka y Carr, 1994) y artificiales (drogas de abuso o autoestimulación) (Spanagel et al., 1992; Shippenberg y Elmer, 1998; De Vries y Shippenberg, 2002; Fernández-Espejo, 2002; Bielajew et al., 2003), y que estos sistemas neuroquímicos son muy abundantes en el NPBe (Carr et al., 1991; Moufid-Bellancourt et al., 1996; Wolinsky et al., 1996; Gutstein et al., 1998; Chamberlin et al., 1999; Engström et al., 2001), cabría la posibilidad que el efecto recompensante de la estimulación eléctrica del NPBe pueda verse afectado por la administración de un antagonista opiáceo, como la naloxona.

## **MÉTODO.**

### **SUJETOS.**

Los sujetos empleados fueron 44 ratas macho de la raza Wistar, suministradas por el Animalario de la Universidad de Granada cuyo peso oscilaba entre 280-360 g al inicio del estudio.

A su llegada al laboratorio, los animales fueron alojados, con agua y comida ad libitum, en jaulas de metacrilato individuales de 30 x 15 x 30 cm cuyo suelo fue recubierto por una fina capa de serrín. El techo estaba constituido por una rejilla metálica y las paredes anterior y posterior eran transparentes, mientras que las laterales eran negras y opacas. Uno de los frontales presentaba dos orificios de 1.5 cm de diámetro aproximadamente, a través de los cuales se podía introducir una boquilla conectada a un depósito con agua. La comida consistía en pienso compuesto para animales de laboratorio (Dietas Panlab S.L., Barcelona, España).

El laboratorio se mantuvo a una temperatura de 20-24° aproximadamente y con un ciclo de luz-oscuridad de 12/ 12, encendiéndose las luces a las 9 a.m. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo durante el periodo diurno.

Los animales permanecieron en estas circunstancias durante un periodo de, al menos, 7 días (adaptación) antes de la intervención quirúrgica.

## **INSTRUMENTOS.**

El procedimiento quirúrgico utilizado se llevó a cabo bajo la acción de anestesia general con Pentotal Sódico (B. Braun Medical S.A., Barcelona, España). Como antiséptico local se empleó Povidona yodada (Betadine, Asta Médica, Madrid) y como profilaxis antibiótica, tras la intervención, se empleó 0.1 cc. de penicilina (Penilevel, Laboratorio Level, S.A., Barcelona, España) a una concentración de 250000 UI/ ml. El antagonista opiáceo que se utilizó en fase experimental fue Naloxona Clorhidrato (Laboratorios Sigma; St. Louis, U.S.A.), en dosis de 4mg./ml./Kg. diluida en agua destilada.

El equipo de estereotaxia empleado fue el modelo Stereotaxic 51600 (Stoelting, USA). Las coordenadas estereotáxicas utilizadas para realizar el implante fueron tomadas a partir del atlas estereotáxico Paxinos y Watson (1996).

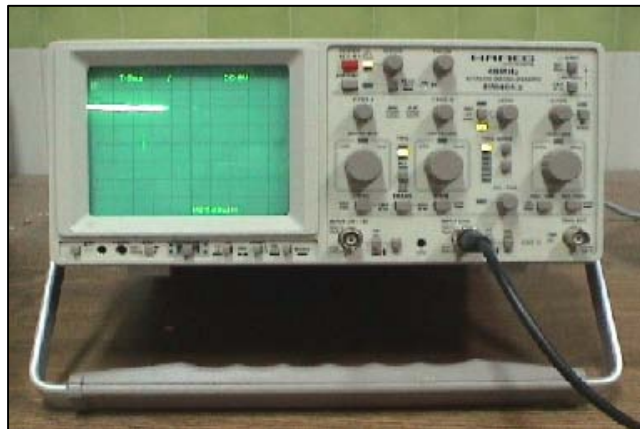
Los electrodos intracerebrales empleados pertenecen a la modalidad monopolar con un diámetro de 200 micras aproximadamente, aislados en toda su longitud con INSL-X excepto en su extremo distal. Estos electrodos se fabricaron utilizando alfileres entomológicos de acero inoxidable (nº 00) a los que se les adosó una sección de acero inoxidable (de uso dental), de unos 3 cm de longitud y de 0.9 mm de diámetro, formando un ángulo recto. Todo ello fue posteriormente aislado hasta el punto de unión de ambas secciones. El electrodo de referencia consistió en una sección de unos 5 cm de longitud de acero inoxidable dental, de 0.9 mm de diámetro. Para la fijación tanto del electrodo intracerebral como del electrodo de referencia (previamente fijado a la superficie del cráneo del animal con tres tornillos de acero inoxidable) se empleó resina acrílica dental (S.R. Denture Base, Quick 3/60, Ivoclar, Liechtenstein).

Durante el procedimiento experimental la estimulación eléctrica del NPBl se efectuó mediante la administración de una corriente pulsante continua controlada por 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 (ver Figura 21). El tren de pulsos aplicados se llevó a cabo con una frecuencia de 66.6 ciclos por segundo.



**Figura 21.** Estimulador CS-20 y unidad de aislamiento ISU 165 (situada sobre el estimulador).

Este equipo de estimulación a su vez, se conectó a un osciloscopio 40 MHz “HM 404-2” (HAMEG Instrument GmbH, Frankfurt, Alemania) que permitía controlar con precisión los parámetros de estimulación (ver Figura 22).



**Figura 22.** Osciloscopio “HAMEG, HM 404-2”.

Durante el proceso de condicionamiento de preferencia por un lugar (CPP), se utilizaron dos modelos de laberintos diferentes:

*Modelo 1* o corredor de preferencia: Consiste en un laberinto rectangular de madera, con unas dimensiones de 50 x 25 x 30 cm, en el que se pueden diferenciar a) una zona central con una superficie de 8 x 25 cm<sup>2</sup>, cuyo suelo es de metacrilato blanco y sus paredes de color madera-natural; b) un compartimiento lateral de 20 x 25 cm, con paredes forradas de papel pintado a rayas blancas y negras de 1 cm. de ancho, en sentido vertical y con un suelo corcho sintético pintado a rayas blancas y negras; y c) otro compartimiento lateral,

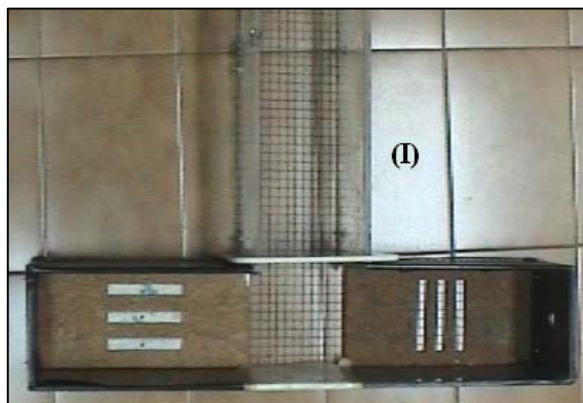
igual al anterior excepto en que la orientación de las rayas en este caso era horizontal y el suelo utilizado fue corcho marrón (ver Figura 23).



**Figura 23.** Vista desde arriba del corredor de preferencia (Laberinto 1) utilizado para el establecimiento del condicionamiento espacial.

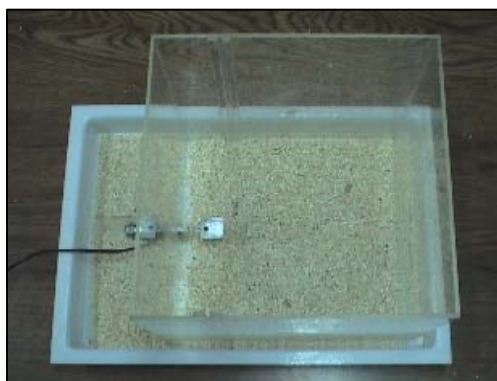
*Modelo 2* o laberinto en T: Laberinto en forma de T, del cual se eliminó uno de sus brazos (I), mediante una compuerta de madera blanca, quedando un corredor cuyas dimensiones fueron 70 x 15 x 15 cm y en el que también se podían diferenciar tres zonas: Una zona central de 10 x 15 cm<sup>2</sup> con suelo de rejilla metálica y paredes blancas; y dos zonas laterales de 30 cm de longitud cada una, con paredes de metacrilato negras, con un orificio circular o cuadrado en las paredes frontales y suelo de corcho marrón con incisiones transversales o longitudinales respectivamente (ver Figura 24).

**Figura 24.** Vista desde arriba del Laberinto en T utilizado para el establecimiento del condicionamiento de preferencia por un lugar. Abreviaturas: (I): Compartimento eliminado.



Finalmente se examinó en estos animales la probabilidad de inducir autoestimulación eléctrica intracerebral (Olds y Milner, 1954), y para ello se empleó una jaula de plexiglás transparente (50 x 55 x 60 cm), con una palanca/ pedal de presión en la

pared frontal que actuaría como interruptor del estimulador y a la cual también estaba conectado un contador de pulsos (ver Figura 25).



**Figura 25.** Vista desde arriba de la caja de Skinner utilizada para el entrenamiento en autoestimulación eléctrica intracerebral.

El análisis histológico se llevó a cabo utilizando un vibrotomo (752M Vibroslice, Campden Instruments), una lupa estereoscópica modelo VMZ-4F, Olympus, Tokio, Japón; y una cámara fotográfica Olympus, PM-6, Tokio, Japón.

## **PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.**

Cada animal era pesado y anestesiado empleando una dosis de 50 mg./ Kg. de pentotal sódico, administrada intraperitonealmente. Una vez anestesiados, y rasurada la parte superior de la cabeza de los animales, ésta era inmovilizada en el estereotáxico (ver Figura 26). Una pequeña incisión longitudinal y la retirada del tejido conjuntivo perióstico adyacente deja visibles los puntos Bregma y Lambda, así como la línea media. Se realizaron 3 orificios sobre el cráneo, en los que se insertaron 3 pequeños tornillos de acero inoxidable, alrededor de los cuales se fijó el electrodo de referencia.



**Figura 26.** Visión lateral de una rata Wistar colocada en el estereotáxico.

Posteriormente se perfora un nuevo orificio de mayor diámetro que los anteriores (Hawkins et al., 1983) a través del cual se introduce el electrodo intracerebral [Coordenadas: AP = - 0.16; V = + 3.0; L = + 2.5; a partir del punto 0 interaural, según el atlas de Paxinos y Watson (1996)]. Finalmente se procede a su fijación con resina acrílica dental recubriendo el implante e incluyendo tanto a los tornillos como el electrodo de referencia hasta dejar la parte superior del cráneo totalmente cubierta.

Para prevenir posibles infecciones se aplicó Povidona yodada alrededor del implante y a todos los animales se les administró 0.1 cc de penicilina intramuscular (i.m.).

Los animales fueron devueltos a sus respectivas jaulas y permanecieron, durante un periodo de recuperación de al menos 10 días, en condiciones de acceso libre a la comida y al agua. Antes de iniciar el procedimiento conductual, 8 ratas tuvieron que ser eliminadas del estudio por pérdida del implante, por lo que la fase conductual se llevó a cabo con 36 animales.

## **PROCEDIMIENTO CONDUCTUAL.**

El procedimiento conductual se llevó a cabo durante el periodo de luz y con ruido blanco de fondo para evitar interferencias en la conducta de los animales provocadas por posibles sonidos fortuitos.

### ***FASE 1: CONDICIONAMIENTO CONCURRENTES DE PREFERENCIA POR UN LUGAR (CPPc) EN EL LABERINTO EN CORREDOR (LABERINTO MODELO 1).***

*Fase de fijación de la intensidad de la corriente eléctrica apropiada.*

Una vez recuperados de la intervención quirúrgica, los animales fueron sometidos a una prueba de exploración para establecer los parámetros de intensidad de la corriente que iban a ser empleados posteriormente en cada animal. Para ello, se procedió a la estimulación eléctrica del NPBe en cada uno de los animales, comenzando con una intensidad de 60  $\mu$ A que fue aumentando progresivamente (de 10 en 10  $\mu$ A) hasta alcanzar el máximo de cada animal podía soportar, evitando siempre niveles de corriente que pudieran generar movimientos involuntarios o respuestas de escape o dolor (saltos o

vocalizaciones) (Tehovnik, 1996). Finalmente los parámetros de intensidad establecidos para los animales oscilaron entre 70 y 150  $\mu$ A. 24 horas mas tarde se inició el procedimiento experimental, que fue desarrollado en 4 fases.

#### *CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIA.*

Esta fase consistió en la estimulación eléctrica concurrente del NPBlé coincidiendo con la estancia voluntaria del animal en una de las zonas espaciales previamente establecidas. Se consideraba que el animal estaba dentro de una de las zonas del laberinto cuando introducía la cabeza y las patas delanteras en ese área. La zona donde los animales iban a recibir la estimulación fue establecida de forma aleatoria antes de comenzar el procedimiento experimental y fue contrabalanceada, de modo que a la mitad de los animales se les administró la estimulación en una zona lateral del laberinto y al resto en el otro lateral.

Para ello, se empleó el laberinto Modelo 1, descrito en el apartado de Instrumentos (ver Figura 23) que fue situado en el centro de la sala, en posición Norte-Sur. El procedimiento fue el siguiente: cada animal era situado en la zona central del corredor al tiempo que se activaba un registro del tiempo. Durante 10 minutos, dos observadores contabilizaban el tiempo que el animal permanecía en cada una de las zonas laterales de dicho laberinto. Este proceso se llevó a cabo en dos ocasiones/ ensayos, con un intervalo de tiempo entre ambas de 24 horas. En función del tiempo (contabilizado en segundos) de permanencia de los animales en la zona donde recibían estimulación eléctrica del NPBlé se establecieron tres grupos. El criterio conductual establecido para la asignación de cada animal a un grupo, 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 compartimiento 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 ese área. Y finalmente se consideraron animales “neutros” a aquellos animales que o bien un día eran “positivos” y en la otra sesión de condicionamiento eran “negativos” o aquellos que no mostraban una preferencia clara 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 se pudo comprobar que, la estimulación eléctrica del NPble inducía preferencias por un lugar en 13 animales (grupo “positivo”), aversión o evitación de la zona de estimulación en 15 animales (grupo “negativo”) e indiferencia por cualquiera de las dos zonas en 8 animales (grupo “neutro”). **A partir de este momento, los animales “neutros” no reciben estimulación** en ninguna de las fases posteriores y pasan a ser utilizados como animales controles.

### ***FASE 2: NALOXONA Y CONDICIONAMIENTO CONCURRENTE DE PREFERENCIA POR UN LUGAR (CPPc) EN EL LABERINTO MODELO 1.***

Transcurridas 48 horas después de finalizar la fase anterior, todos los animales recibieron una inyección vía subcutánea (4 mg./ ml./ Kg.) de naloxona y 20 minutos después cada uno de los animales de los distintos grupos fue nuevamente sometido a una sesión de CPP concurrente similar a la descrita anteriormente en el laberinto modelo 1, registrándose el tiempo de permanencia en cada una de las áreas laterales.

### ***FASE 3: NALOXONA Y CCPc EN EL LABERINTO EN T (LABERINTO MODELO 2).***

Con el fin de examinar el efecto que hubiera podido tener la experiencia previa sobre el aprendizaje, 48 horas desde la fase anterior, cada animal recibió una nueva inyección subcutánea de naloxona (4mg./ ml./ Kg.) 20 minutos antes de ser sometido a una nueva sesión de CPP, pero ahora en el laberinto modelo 2 (ver apartado de Instrumentos, ver Figura 24). En este nuevo proceso de condicionamiento, además de cambiar las claves estímulares internas, también se modificaron los índices espaciales externos mediante una orientación distinta del laberinto (siendo en este caso Este/ Oeste).

### ***FASE 4: INDUCCIÓN DE AUTOESTIMULACION ELÉCTRICA INTRACEREBRAL.***

Pasadas dos semanas desde la última fase conductual, los mismos animales implantados en el NPble, fueron sometidos a un procedimiento experimental estándar de autoestimulación intracerebral (Hawkins et al., 1983; Cubero y Puerto, 2000; Simón, 2003).

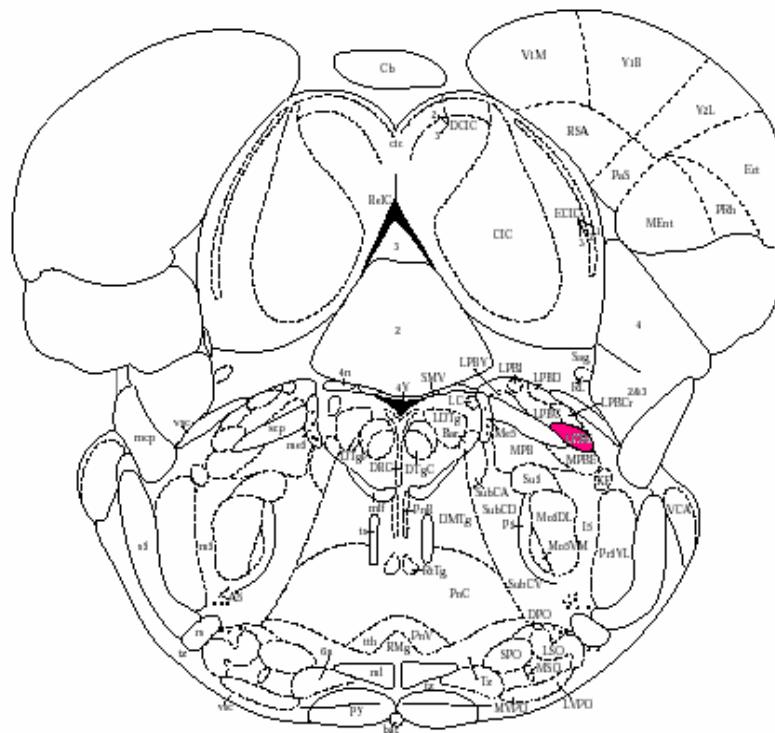
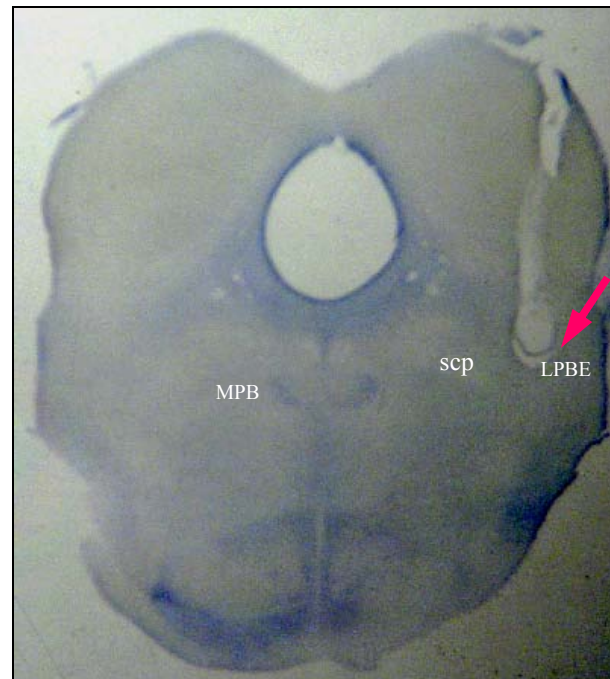


Este procedimiento se llevó a cabo en la caja de Skinner descrita en el apartado de Instrumentos (ver Figura 25). Cada presión de la palanca por parte del animal suministraba un tren de pulsos cuyos parámetros habían sido predeterminados por el experimentador. Concretamente, la frecuencia empleada fue de 66.6 ciclos/ segundo (c.p.s.), la duración de cada pulso 0.1 ms. y la duración de cada tren de pulsos se estableció en 0.25 s. para cada uno de los animales. La intensidad de la corriente empleada fue necesariamente distinta en cada animal, aunque la máxima intensidad de corriente empleada estuvo siempre por debajo del umbral en el cual se puedan manifestar alteraciones motoras o conductuales apreciables.

En este caso y, como es habitual, al comienzo del entrenamiento, el experimentador moldea la respuesta del animal administrándole estimulación eléctrica cada vez que se aproxima a la palanca de presión, hasta conseguir que el animal realice por sí solo la respuesta operante correcta, es decir la autoadministración eléctrica intracerebral.

## **HISTOLOGÍA.**

Tras finalizar las pruebas conductuales, los animales recibieron una sobredosis de Pentotal sódico (0.25 mg.) y se realizó una pequeña lesión electrolítica (0,3 mA. de corriente catódica continua durante 5 segundos) a fin de marcar la zona donde había quedado implantado el electrodo. Posteriormente, fueron perfundidos con 10 ml suero salino y 10 ml de una solución de formol al 40 % intracardialmente. Los cerebros fueron extraídos y conservados en paraformaldehído al 10 % para posteriormente ser seccionados en láminas coronales de 80 micras con un vibrotomo. Estas láminas de tejido cerebral fueron montadas en portaobjetos y teñidas con una tinción con Violeta de Cresilo, para finalmente ser examinadas con una lupa estereoscópica y fotografiadas (ver Figura 27).



**Figura 27.** Sección transversal del cerebro de un animal representativo del grupo “positivo” que muestra la localización del tracto del electrodo. El Núcleo Parabraquial Lateral Externo aparece coloreado en rosa en la lámina inferior. Abreviaturas: LPBE, Núcleo Parabraquial Lateral Externo; MPB, Núcleo Parabraquial Medial; scp, Pedúnculo Cerebeloso Superior.

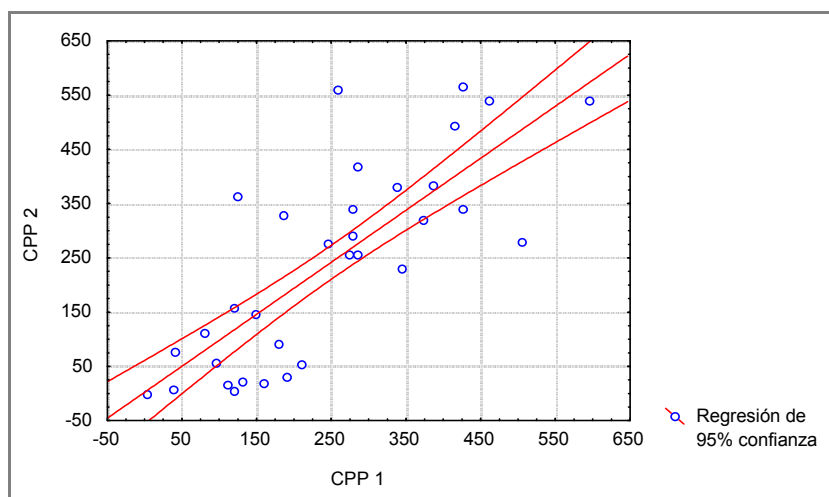
## ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

A dos animales del grupo experimental “negativo” y a uno del grupo “positivo” se les desprendió el implante en la última prueba de condicionamiento espacial, por lo que en esa fase del estudio fueron eliminados del análisis estadístico, quedando en ese caso el grupo “negativo” con 13 animales y el grupo “positivo” con 12.

## RESULTADOS.

### ***Fase 1: CPPc en el Laberinto Modelo 1 o con forma de corredor.***

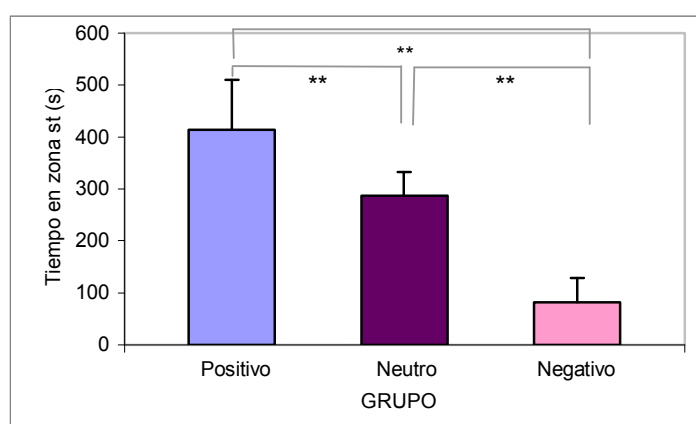
Para el análisis de los datos obtenidos en las dos sesiones de adquisición (llevadas a cabo en el laberinto Modelo 1) se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson. Los resultados obtenidos indican que existe una correlación significativa entre las dos sesiones de condicionamiento ( $r = 0.8063$ ,  $p < 0.001$ ) (ver Figura 28).



**Figura 28:** Matriz de correlación entre el tiempo de permanencia de los animales en el compartimento estimulado en cada una de las dos sesiones de condicionamiento de preferencia.

Aplicando el criterio conductual establecido anteriormente, los animales fueron asignados a tres grupos (“positivo”, “negativo” y “neutro”) en función del tiempo de

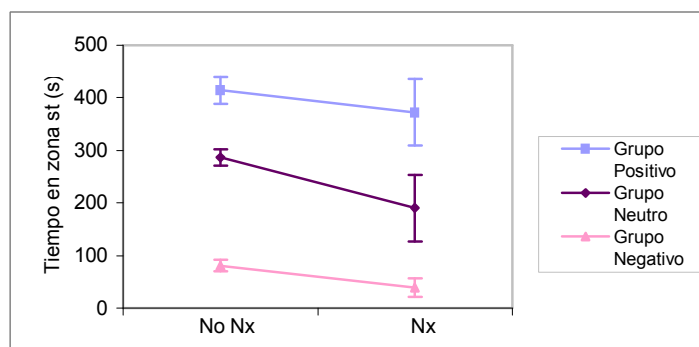
permanencia en el compartimiento asociado a la estimulación, durante las dos sesiones de condicionamiento. El grupo “positivo” presentó un promedio de permanencia en la zona asociada a la estimulación de 414.42 s.; el grupo “negativo” de 81.05 s., y el grupo “neutro”, 286.75 s. Considerando el valor promedio del tiempo que los animales pasan en el compartimiento estimulado en los dos ensayos de condicionamiento como índice de aprendizaje, se realizó un ANOVA unifactorial entre grupos. Como cabría esperar, los resultados muestran que existen diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,33)} = 83.08$ ;  $p < 0.001$ ) (ver Figura 29).



**Figura 29.** Representación gráfica del tiempo de permanencia medio (media de las dos sesiones de condicionamiento expresado en segundos) mostrado por los distintos animales en la zona del laberinto en corredor (Laberinto Modelo 1) asociada a la estimulación eléctrica del NPBl, según el grupo. Los asteriscos (\*\*) muestran las diferencias entre los grupos a un nivel de significación de 0.001.

### ***Fase 2: CPPc: Efecto de la administración de naloxona en el Laberinto Modelo 1.***

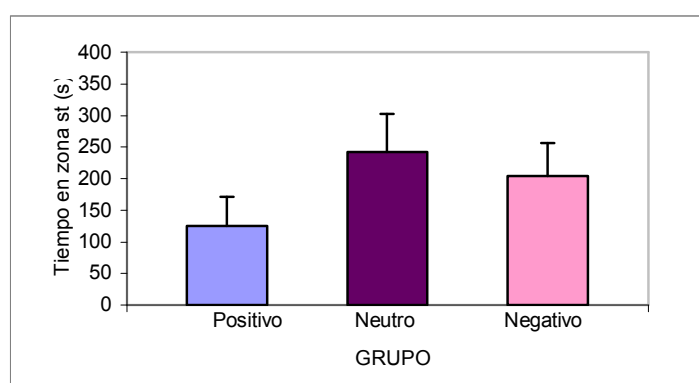
Para comprobar si el efecto obtenido en la fase 1, podía estar mediado por el sistema opiáceo endógeno, se administró un antagonista opiáceo, la naloxona. Los resultados obtenidos demuestran a través de un ANOVA bifactorial mixto (Grupo x Sustancia), que no existe un efecto principal de la sustancia [ $F_{(1,33)} = 2.91$ ,  $p < 0.097$ ], ni de la interacción Grupo x Sustancia [ $F_{(2, 33)} = 0.21$ ,  $p < 0.81$ ] (ver Figura 30), aunque si es significativo el efecto principal del factor grupo [ $F_{(2, 33)} = 54.30$ ;  $p < 0.001$ ]. El análisis del efecto principal del factor grupo, mediante comparaciones post hoc utilizando el test Newman-Keuls, muestra diferencias significativas entre todos los grupos ( $p < 0.01$ ).



**Figura 30.** Representación gráfica del efecto de la administración de naloxona (No Nx: No administración de naloxona; Nx: Administración de naloxona) sobre el tiempo de permanencia (expresado en segundos) en la zona del laberinto Modelo 1 asociada a la estimulación eléctrica del NPBl, manifestado por los animales, según el grupo.

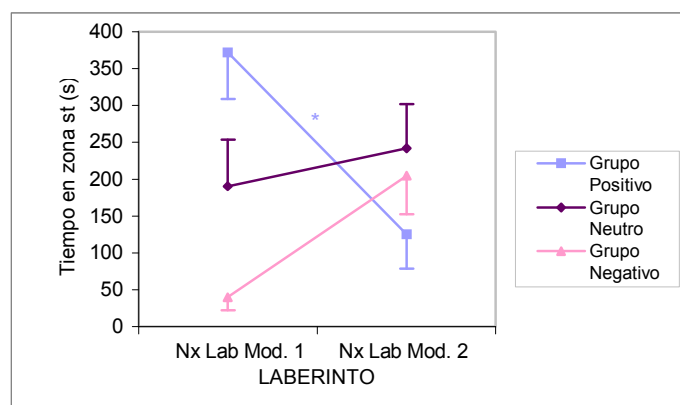
### **Fase 3: CPPc en el Laberinto Modelo 2: Efecto de la administración de Naloxona.**

El resultado anterior podría ser interpretado como una consecuencia de la retención del aprendizaje previo de los animales. Para comprobar esta posibilidad, se administró Nx y se procedió al establecimiento del CPP concurrente en un nuevo laberinto (Laberinto Modelo 2). El análisis de los resultados en este laberinto Modelo 2, mediante un ANOVA unifactorial entre grupos, permitió comprobar que la naloxona había bloqueado las diferencias entre los grupos [ $F_{(2, 33)} = 1.08, p < 0.35$ ], como muestra la siguiente gráfica (Figura 31):



**Figura 31.** Representación gráfica del tiempo de permanencia (expresado en segundos) mostrado por los animales, en la zona del Laberinto en T o Modelo 2 asociada a la estimulación eléctrica del NPBl, tras la administración subcutánea de naloxona, según el grupo.

Al comparar el efecto de la administración de naloxona en el Laberinto Modelo 2 con el obtenido en el Laberinto Modelo 1, mediante un ANOVA bifactorial mixto (Grupo x Laberinto), se obtiene un efecto significativo de la interacción ( $F_{(2,33)} = 7.64$ ,  $p < 0.0018$ ) (ver Figura 32). Para analizar este efecto se empleó un análisis de comparaciones post hoc Newman-Keuls, mostrando que existían diferencias significativas en el grupo “positivo” según el laberinto empleado (Modelo 1 vs. Modelo 2,  $p = 0.027$ ), aunque no se observaron diferencias en los demás grupos (grupo “negativo”,  $p = 0.128$ ; grupo “neutro”  $p = 0.865$ ). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos en el Laberinto Modelo 2 ( $p > 0.05$ ).



**Figura 32.** Representación gráfica del tiempo de permanencia (expresado en segundos) en la zona asociada a la estimulación eléctrica del NPBe, mostrado por los animales de los distintos grupos, tras la administración subcutánea de naloxona, en función del laberinto empleado (Laberinto Modelo 1 vs. Laberinto Modelo 2). El asterisco (\*) muestra las diferencias en el grupo “positivo” a un nivel de significación de 0.05.

#### **Fase 4: Inducción de Autoestimulación Eléctrica Intracerebral (AEIC).**

Con respecto a la prueba de inducción de autoestimulación intracerebral, se puede concluir que ninguno de los animales consiguió desarrollar las adecuadas respuestas operantes de forma espontánea y voluntaria, a pesar del periodo de moldeamiento efectuado previamente (ver Figura 33).



**Figura 33.** Fotografía de una rata Wistar en la una caja de Skinner para autoestimulación eléctrica intracerebral (AEIC).

## **DISCUSIÓN.**

Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto que la estimulación eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo induce preferencias por los lugares que han sido asociados a la activación eléctrica de este núcleo. También aparecen animales que evitan sistemáticamente la zona espacial asociada a la estimulación intracerebral. Un tercer grupo de animales no presenta tendencias definidas por el lugar asociado a la estimulación eléctrica o por el lugar no estimulado.

En este contexto, la administración de naloxona, no bloquea el efecto de preferencia por el lugar observado tras la activación de del NPBLE cuando se utiliza el mismo laberinto en el que tuvo lugar el aprendizaje inicial (ver Figura 30). Este resultado puede deberse a la retención de la preferencia previamente establecida, de modo que los animales siguen eligiendo la zona del laberinto asociada a la estimulación intracerebral, probablemente esperando el consiguiente efecto reforzante. Por su parte, los animales que habían aprendido a evitar la zona estimulada del laberinto continúan evitando esa zona, eligiendo la zona alternativa.

Para examinar la posibilidad de que se hubiera podido producir un efecto de retención del aprendizaje, se repitió el experimento, pero ahora el proceso de adquisición se llevó a cabo en un nuevo laberinto, en el cual no existía experiencia previa (ver Figura 32). Ahora, el pretratamiento con el antagonista opiáceo, bloqueaba los efectos reforzantes de la estimulación, impidiendo la adquisición de preferencias por un lugar (ver Figuras 31 y 32); sin afectar a los restantes grupos experimentales. Este resultado no parece deberse a una

alteración colateral de carácter motor provocada por la administración de naloxona, ya que no se observan cambios en el patrón conductual mostrado por los animales que pertenecen al grupo neutro. Tampoco aparecen efectos aversivos asociados a la administración de naloxona, ya que no se observa ninguna modificación en el comportamiento en el grupo negativo o del grupo neutro, el último de los cuales continúa sin manifestar una clara preferencia o aversión por ninguna de las zonas. El grupo negativo incrementa el tiempo de permanencia en la zona estimulada, lo cual es compatible con los datos aportados por otras investigaciones en las que se demuestra que, el efecto aversivo inducido por estimulación eléctrica de distintas áreas cerebrales, como el Colículo Superior o la Sustancia Gris Periacueductal dorsal, es bloqueado por la administración de un antagonista opiáceo (Eichenberger et al., 2002; Coimbra et al., 1996; Coimbra et al., 2000). En cualquier caso, la naloxona se administra 20 minutos antes de la prueba y difícilmente puede afectar a una u otra de las zonas de los laberintos.

El efecto obtenido mediante la estimulación eléctrica del NPBlé sugiere que este subnúcleo podría estar implicado en procesos reforzantes, formando parte de alguno de los sistemas de recompensa existentes. Numerosos estudios muestran la existencia en el NPBlé de una elevada cantidad de receptores opiáceos  $\mu$  y  $\kappa$  (Lynch, 1986; Mansour et al., 1988; 1994; 1995) así como terminales inmunorreactivas a péptidos opiáceos endógenos como las encefalinas o las endomorfinas 1 y 2 (Maley y Panteón, 1988; Hermanson y Blomqvist, 1997; Chamberlin et al., 1999; Engström et al., 2001; Chen et al., 2004). Asimismo, y con respecto a los variados efectos de la estimulación intracerebral, distintas investigaciones han demostrado la existencia de sistemas de opiáceos con efectos opuestos, mediados por receptores  $\mu$  y  $\kappa$  respectivamente (Spanagel et al., 1992; Bals-Kubick et al., 1993; Pan, 1998; Narita et al., 2001).

Los datos aportados por otros estudios sobre la implicación del NPBlé en el procesamiento de las propiedades motivacionales reforzantes de los opiáceos no son tan claros. Así algunas investigaciones relacionan al Núcleo Parabraquial con la codificación de las propiedades discriminativas de la morfina (Jaeger y Van der Kooy, 1993; 1996), aunque no han logrado inducir preferencias gustativas y/ o por el lugar tras la administración intrapabraquial de morfina (Jaeger y Van der Kooy, 1996; Nader et al., 1997). Estos resultados negativos que podría cuestionar indirectamente la implicación del NPBlé en los procesos reforzantes de los opiáceos, podrían depender de los requerimientos temporales de la tarea utilizada, así como las posibles diferencias en la localización de la zona activada. Con respecto a la primera posibilidad, mientras en nuestro estudio se utiliza



un procedimiento concurrente, los resultados aportados por el grupo de van der Kooy, se llevan a cabo en una tarea de tipo secuencial.

Este efecto de bloqueo de la naloxona se manifiesta más poderoso que en el refuerzo observado por la autoestimulación en el Área Tegmental Ventral (Bielajew et al., 2003). Este comportamiento de AEIC no ha podido ser reproducido con animales NPBl, al menos con la facilidad con que se genera en otras zonas como el Hipotálamo Lateral (Hawkins et al., 1993; Simón, 2003) un hecho que en la actualidad está siendo analizado en nuestro laboratorio y que puede tener especial relevancia.

En resumen, los datos obtenidos tras la administración de naloxona, permiten concluir que este antagonista opiáceo no sólo bloquea el efecto reforzante de la estimulación sino que parece provocar un estado motivacional negativo en este grupo de animales que, a nivel conductual se refleja por su conducta de evitación o aversión hacia la zona asociada a la estimulación. Este comportamiento también ha sido descrito en estudios llevados a cabo con sustancias de abuso y en las que se ha comprobado que la administración de dosis muy bajas de naloxona provoca efectos conductuales aversivos en animales que previamente habían sido tratados con morfina (McDonald et al., 1997; Blokhina et al., 2000; Parker et al., 2002).

Mediante pruebas de condicionamiento de preferencia por un lugar se registran las respuestas motivadas de aproximación mostradas por los animales hacia claves espaciales y del entorno que, mediante un mecanismo de aprendizaje asociativo han adquirido un valor reforzante o aversivo tras su emparejamiento con la estimulación del NPBl. En este sentido, la administración de naloxona actuaría sobre el efecto reforzante de la estimulación, algo que resultaría necesario para el establecimiento inicial del condicionamiento de preferencia por un lugar. Sin embargo, si el condicionamiento de preferencia ya se hubiera producido, los animales ante los mismos índices contextuales, mostrarían la respuesta conductual aprendida aún en ausencia del estímulo reforzante. De hecho se ha comprobado que, en un paradigma de CPP, la administración repetida de morfina asociada a una determinada zona del laberinto, provoca una preferencia por dicha área, que incluso puede permanecer durante semanas en ausencia de la administración de la morfina (Mueller et al., 2002; Bodnar y Hadjimarkou, 2003).

Un efecto muy similar fue el obtenido por McFarland y Ettenberg (1998) con animales que recibían heroína o suero fisiológico tras atravesar un corredor para llegar a un

compartimento meta. Estos autores observaron que los animales tardaban menos tiempo en recorrer el corredor en presencia del estímulo discriminativo (un olor) que precedía la administración de heroína, que ante el que anticipaba suero fisiológico. Tras la administración de naloxona, los animales seguían corriendo más rápidamente en presencia del estímulo asociado con la heroína, pero 24 horas después, estos mismos animales ya recorrían el laberinto mucho más lentamente. Consideran estos autores que la administración de naloxona, no afecta a la motivación de los animales para conseguir la droga, ya que en el primer ensayo con naloxona, no se producen cambios en la rapidez de los sujetos. Pero, si afectaría al refuerzo derivado de la administración de la heroína, por lo que en los posteriores ensayos se observa un descenso de la respuesta dependiente de la dosis administrada de naloxona (McFarland y Ettenberg, 1998).

En este sentido, Nader y colaboradores (1997) han demostrado que con respecto al complejo NPB lateral, los efectos motivacionales reforzantes o aversivos que posee la morfina y la capacidad de ésta para inducir un conjunto de estímulos interoceptivos específicos que son percibidos por el animal y que pueden ser utilizados como estímulo predictivo o discriminativo (propiedades discriminativas) para facilitar el aprendizaje asociativo, también podrían estar mediados por distintos sustratos neurales. Así, mientras que lesiones de esta estructura pontina bloqueaba los efectos motivacionales aversivos inducidos por la administración de morfina, no afectaba a la capacidad que esta sustancia posee para actuar como estímulo discriminativo en una tarea de AAG. De acuerdo con esto, estos autores proponen que los sistemas neurobiológicos implicados en el refuerzo y en el proceso de atribución de incentivo, son distintos y pueden actuar de forma independiente. En este sentido consideran que el contacto con estímulos reforzantes (por ejemplo las drogas de abuso) o con los estímulos asociados a éstos, pueden activar ambos sustratos de forma simultánea, pero la conducta de aproximación hacia dichos estímulos así como las propiedades discriminativas que algunas de estas sustancias poseen (en este caso la morfina), podrían estar controladas por procesos implícitos no conscientes, independientemente del sistema de refuerzo.

Otros autores consideran sin embargo que, aunque estos dos procesos están mediados por sustratos anatómicos distintos, estarían interrelacionados (Berridge y Robinson, 1998). En este sentido, y en contra de lo planteado anteriormente, Berridge y otros, consideran que el proceso de atribución de incentivo mediante el cual un determinado estímulo adquiere la propiedad de dirigir la conducta, requiere un aprendizaje asociativo de tipo explícito (Berridge y Robinson, 1998; Ikemoto y Panksepp, 1999), de forma que el

animal sea capaz de transferir dicho aprendizaje a un nuevo contexto, en el cual existan unas condiciones distintas a las presentes durante la adquisición del condicionamiento (Reber et al., 1996; Eichenbaum, 2002).

Para examinar si el NPBe está implicado en procesos de aprendizaje asociativo de tipo secuencial o explícito, o por el contrario, como sugieren algunos de los estudios presentados, podría formar parte de un sistema neurobiológico en el que la contigüidad temporal y la transmisión de la información vía neural fuera decisiva, en el siguiente capítulo de esta Tesis Doctoral se utilizarán tareas discriminativas en contigüidad y demoradas.

**CAPÍTULO II: PREFERENCIAS GUSTATIVAS  
INDUCIDAS POR ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA  
DEL NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL  
EXTERNO EN TAREAS DE DISCRIMINACIÓN  
DEMORADAS Y EN CONTIGÜIDAD.**



## **INTRODUCCIÓN**

Dentro del Complejo Parabraquial Troncoencefálico, su parte lateral (NPBl) ha sido relacionada con el procesamiento de la información de tipo víscero-sensorial y nociceptiva, así como con el control de las respuestas autonómicas, conducta emocional, la ingesta de alimentos, el dolor, etc. (Herbert et al., 1990; Moga et al., 1990; Bernard et al., 1993; Krukoff et al., 1993; Saleh y Cechetto, 1993; Jia et al., 1994; Saper, 1995; 1995b; Yoshida et al., 1997; De Lacalle y Saper, 2000; Krukoff y Loewy, 2000; Reilly y Trifunovic, 2000a, b; etc...).

En su extremo ventrolateral se encuentra el Núcleo Parabraquial Lateral Externo (NPBLE) (Fulwiler y Saper, 1984; Moga et al., 1990; Herbert y Bellintani-Guardia, 1995), que ha sido implicado en el procesamiento de información víscero-gustativa (De Lacalle y Saper, 2000; Karimnamazi et al., 2002). Este núcleo recibe información gustativa a través de la porción rostral del Núcleo del Tracto Solitario (NTSr), así como abundante información de tipo visceral procedente del Nervio Vago-NTS caudal y desde el Área Postrema (Papas y Ferguson, 1990; Halsell y Travers, 1997; De Lacalle y Saper, 2000). Diversos estudios han demostrado su participación en funciones de índole visceral-aversiva tales como las resultantes de la administración de cloruro sódico hipertónico, cloruro de litio, sulfato de cobre (Yamamoto et al., 1992; Gu et al., 1993; Kobashi et al., 1993; Swank y Bernstein, 1994; Yamamoto y Sawa, 2000a; b) o apetitivas, como la infusión intragástrica de sustancias nutritivas, como la lactosa o la glucosa (Yamamoto y Sawa, 2000a, b; Wang et al., 1999). Igualmente, el NPBLE ha sido implicado en el procesamiento de sustancias endógenas relacionadas con la ingesta, como la colecistoquinina (Li y Rowland, 1995; Trifunovic y Reilly, 2001) o la propia leptina (Elías et al., 2000).

Por otra parte, este núcleo ha sido relacionado con el sistema Espino-Trigémino-Amigdalino implicado en la transmisión de la información relacionada con el dolor (Bester et al., 1995; Saper, 1995b; Jasmin et al., 1997; Bernard y Bandler, 1998; Buritova et al., 1998; Engblom et al., 2000) y en el procesamiento de los aspectos afectivos o emocionales de los estímulos dolorosos (Bernard et al., 1991; 1994; 1995; Light et al., 1993; Bester et al., 1995; 1997; Saper, 1995; Jasmin et al., 1997; Bernard y Bandler, 1998; Craig y Dostrovsky, 1999).

Así pues, el NPBe podría estar implicado en el procesamiento de la información tanto de índole apetitiva como aversiva. De hecho, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio lo han relacionado tanto con el aprendizaje aversivo gustativo (Mediavilla et al., 2000; 2005) como en la inducción de preferencias gustativas mediante la administración intragástrica de nutrientes reforzantes (Zafra et al., 2002). En ambos casos, esta implicación sólo tiene lugar en tareas de aprendizaje de tipo concurrente, pero no en aprendizajes secuenciales. En el primer caso, la ingesta de un estímulo gustativo es asociada con la administración **simultánea** del tratamiento aversivo o recompensante; mientras que en el aprendizaje de tipo secuencial, el consumo del estímulo gustativo va seguido, tras una **demora** (15 minutos), de la administración del tratamiento aversivo o reforzante (para una revisión reciente, Mediavilla et al., 2005). Estas dos modalidades de aprendizaje han sido relacionadas respectivamente, con los aprendizajes implícitos/ procedimentales y los explícitos/ declarativos, ampliamente descritos por la bibliografía para explicar el aprendizaje y la memoria (Squire, 1987; 1992; 1998; Nadel, 1992; Cohen y Eichenbaum, 1994; Squire y Zola, 1996; Mediavilla et al., 2001; 2005).

La estimulación eléctrica intracerebral es un sustituto adecuado para el desarrollo de aprendizajes de preferencias (Cubero y Puerto, 2000; Simón, 2003) así como para la inducción de aversiones hacia los estímulos con los que es asociada (Gallo et al., 1988; Agüero et al., 1993; Simón et al., 2008). De hecho, la estimulación eléctrica del NPBe induce preferencias gustativas (Simón, 2003) y condicionamientos de preferencia por un lugar (Simón, 2003; Capítulo I de esta Tesis Doctoral) cuando la estimulación es administrada inmediatamente después de la ingesta del sabor, o de forma concurrente a la estancia del animal en una determinada zona de un laberinto. Las características de estos procedimientos, permiten interpretar los resultados en el sentido de una necesaria asociación por contigüidad (característico de los aprendizajes implícitos), pero también podría ser efectivo cuando se introduce una demora/ intervalo de tiempo entre la presentación del estímulo gustativo y el efecto reforzante de la estimulación eléctrica.

Para comprobar estas alternativas se ha diseñado el Experimento 2, en el que se utiliza una tarea de aprendizaje discriminativo en el que se introduce una demora temporal de 15 minutos entre el estímulo gustativo y la estimulación eléctrica del NPBe; y el Experimento 3, en el que el aprendizaje de preferencias se produce a través de un aprendizaje en contigüidad.

Por último, si como sugieren algunos autores, ambas modalidades de aprendizaje se diferencian en cuanto a su flexibilidad, este estudio, utilizará un Test de Inversión (Mediavilla et al., 2000), en el que una vez establecido el aprendizaje, se invertirá la posición derecha/ izquierda de los estímulos gustativos, y así comprobar si los animales son capaces de adecuar su conducta a los nuevos requerimientos de la tarea.



## **EXPERIMENTO 2: Preferencias gustativas inducidas por estimulación eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo en tareas de discriminación secuenciales demoradas.**

---

### **MÉTODO.**

#### **SUJETOS.**

En este experimento se utilizaron 26 ratas macho albinas, raza Wistar, suministradas por el Estabulario de la Universidad de Granada, cuyo peso al inicio del experimento osciló entre 280 y 340 g.

Hasta el inicio del protocolo experimental, los animales se mantuvieron en el laboratorio en las condiciones generales descritas en el apartado de Método del Capítulo I.

#### **INSTRUMENTOS.**

Las jaulas utilizadas para los animales así como los materiales requeridos para el procedimiento quirúrgico fueron los mismos que los empleados en el experimento anterior (ver apartado de Instrumentos del Capítulo I de esta Tesis Doctoral).

El equipo empleado para administrar y monitorizar la estimulación eléctrica, así como el material utilizado para llevar a cabo la histología, también fue idéntico al descrito en el Capítulo anterior.

En la prueba de condicionamiento espacial se utilizó el laberinto en corredor (Modelo 1) descrito en el apartado de Instrumentos del Capítulo I.

Los estímulos gustativos empleados fueron preparados con una concentración de 0.5 cc. de extracto con sabor a "Fresa" o a "Coco" según el caso, por cada 100 ml. de agua (McCormick, Co. Inc. San Francisco, California)

## **PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.**

Transcurrido el periodo de adaptación de siete días al laboratorio, los animales fueron sometidos a una intervención quirúrgica (implantación de un electrodo monopolar en el NPble) idéntica a la descrita en el Experimento 1. A continuación, los animales pasaron por un periodo de recuperación de al menos 10 días, durante el cual disponían de comida y agua ad libitum.

## **PROCEDIMIENTO CONDUCTUAL.**

### ***FASE 1: CONDICIONAMIENTO CONCURRENTES DE PREFERENCIAS POR UN LUGAR (CPPc) EN EL LABERINTO MODELO 1.***

*Fase de fijación de la intensidad adecuada para el procedimiento conductual.*

El objetivo de esta fase pretende siempre establecer los niveles óptimos de intensidad de la corriente que va a ser empleada con cada animal durante todo el experimento. Este procedimiento se llevó a cabo dos días antes del comienzo del CPP y fue similar al descrito en el Experimento 1, para que la estimulación no pudiera provocar alteraciones motoras o respuestas de escape (Tehovnik, 1996). En este experimento, los niveles de intensidad empleados oscilaron entre 70 y 170  $\mu$ A.

### ***CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIA.***

Los animales, transcurridas 48 horas desde la fase anterior y durante la cual los animales dispusieron de agua y comida libremente, fueron sometidos a un procedimiento de CPPc con el objetivo de identificar a los animales en los que la estimulación eléctrica del

NPBle era reforzante. Dicho condicionamiento se llevó a cabo en el laberinto en corredor descrito en el apartado de Instrumentos del Experimento 1, y se estableció de forma similar a la descrita en dicho experimento. Es decir, la mitad de los animales recibían estimulación eléctrica intracerebral en una de las zonas laterales del corredor de forma concurrente a su estancia en dicha área, mientras que para la otra mitad de los animales la estimulación era asociada a su permanencia en la otra zona de dicho corredor (balanceadas apropiadamente a lo largo del experimento). Este procedimiento se registró en dos ocasiones (dos ensayos).

Conforme al criterio conductual establecido en el Experimento 1 para distribución de los animales, se comprobó que 9 animales mostraron preferencias por la zona del corredor asociada a la estimulación. El resto de los animales (14 de los cuales 11 prefirieron la zona no estimulada y 3 se mostraron indiferentes o neutros) fueron utilizados como controles en este experimento, por lo que a partir de ese momento no volvieron a recibir estimulación eléctrica en ninguna de las pruebas conductuales posteriores.

## ***FASE 2: APRENDIZAJE SECUENCIAL DE PREFERENCIAS GUSTATIVAS.***

### *Fase de Preentrenamiento.*

Transcurridas 48 horas desde la fase de condicionamiento espacial (en las que los animales disponían de comida y agua libremente), se inició el proceso para la inducción de preferencias gustativas. Esta fase comienza privando de agua a los animales, para favorecer la ingesta del estímulo gustativo durante la fase experimental y con una limitación en el alimento disponible (14 g. al día). El primer día de privación, los animales disponían de agua durante 10 minutos/ día, mientras que en el segundo día el tiempo se redujo a 7 minutos. El agua era suministrada a través de buretas graduadas que fueron presentadas alternando cada día la posición derecha /izquierda. Una vez finalizada la ingesta de agua, se ofrecía el alimento sólido (14 g. diarios).

A lo largo del periodo de adquisición de las preferencias gustativas, se utilizó ruido blanco de fondo para amortiguar las posibles interferencias acústicas fortuitas que pudieran surgir durante el desarrollo del experimento.

*Aprendizaje de Preferencias Gustativas.*

Una vez fijados los conectores de estimulación eléctrica intracerebral y después de haber comprobado que los implantes se mantenían en perfecto estado, se iniciaban las sesiones experimentales.

El procedimiento general consistía en la presentación cada día y durante 7 minutos diarios, de uno de los estímulos gustativos neutros y novedosos, agua con sabor a “Fresa” o a “Coco” (ver Esquema 1).

|                       | Sesión 1  | Sesión 2   | Sesión 3   | Sesión 4   | TEST  |
|-----------------------|---|--|------------|------------|---|
| Mitad de los animales | FRESA (izda.)<br>(7 min.)<br>+<br>15 minutos<br>+<br>ESTIMULACIÓN<br>(10 minutos)       | COCO (dcha.)<br>(7 min.)<br>+<br>15 minutos<br>+<br>NO<br>ESTIMULACIÓN<br>(10 minutos) | = Sesión 1 | = Sesión 2 | FRESA (izda.)<br><br><br><br>COCO (dcha.)<br><br>7 min. |
| Mitad de los animales | FRESA (izda.)<br>(7 min.)<br>+<br>15 minutos<br>+<br>NO<br>ESTIMULACIÓN<br>(10 minutos) | COCO (dcha.)<br>(7 min.)<br>+<br>15 minutos<br>+<br>ESTIMULACIÓN<br>(10 minutos)       | = Sesión 1 | = Sesión 2 | FRESA(izda.)<br><br><br><br>COCO (dcha.)<br><br>7 min.  |

**Esquema 1:** Procedimiento conductual empleado en el Experimento 2.

Una vez finalizado este tiempo, se registra la cantidad consumida. Transcurridos 15 minutos desde la finalización del periodo de ingesta, la mitad de los animales del grupo experimental, recibían la estimulación eléctrica del NPBe durante 10 minutos, con corriente directa pulsante, administrada en pulsos individuales de 0.1 ms. de duración, con una frecuencia de 66.6 c.p.s. y con la intensidad establecida para cada animal. La otra mitad de los animales aunque con los electrodos conectados, no reciben estimulación eléctrica alguna. El sabor asociado a la estimulación fue balanceado aleatoriamente de modo que para la mitad de los animales el estímulo gustativo asociado a la estimulación fue la “Fresa”, mientras que para la otra mitad fue el “Coco”. Como se ha mencionado anteriormente, los animales “controles” no reciben estimulación aunque mantuvieron fijados los electrodos.

Al final de cada sesión los electrodos son desconectados de los dispositivos de estimulación y cada animal recibe 14 gramos de comida. Los cuatro días del proceso de adquisición (dos ensayos) fueron seguidos de un quinto día en el que todos los animales son sometidos a una Prueba de Discriminación (*Test de Discriminación Simultánea*) en la cual se les ofrecen, de forma simultánea y durante 7 minutos los estímulos gustativos, Fresa y Coco, en la misma posición que habían sido presentados durante el proceso de adquisición, registrando la cantidad consumida en cada caso (ver Figura 34).

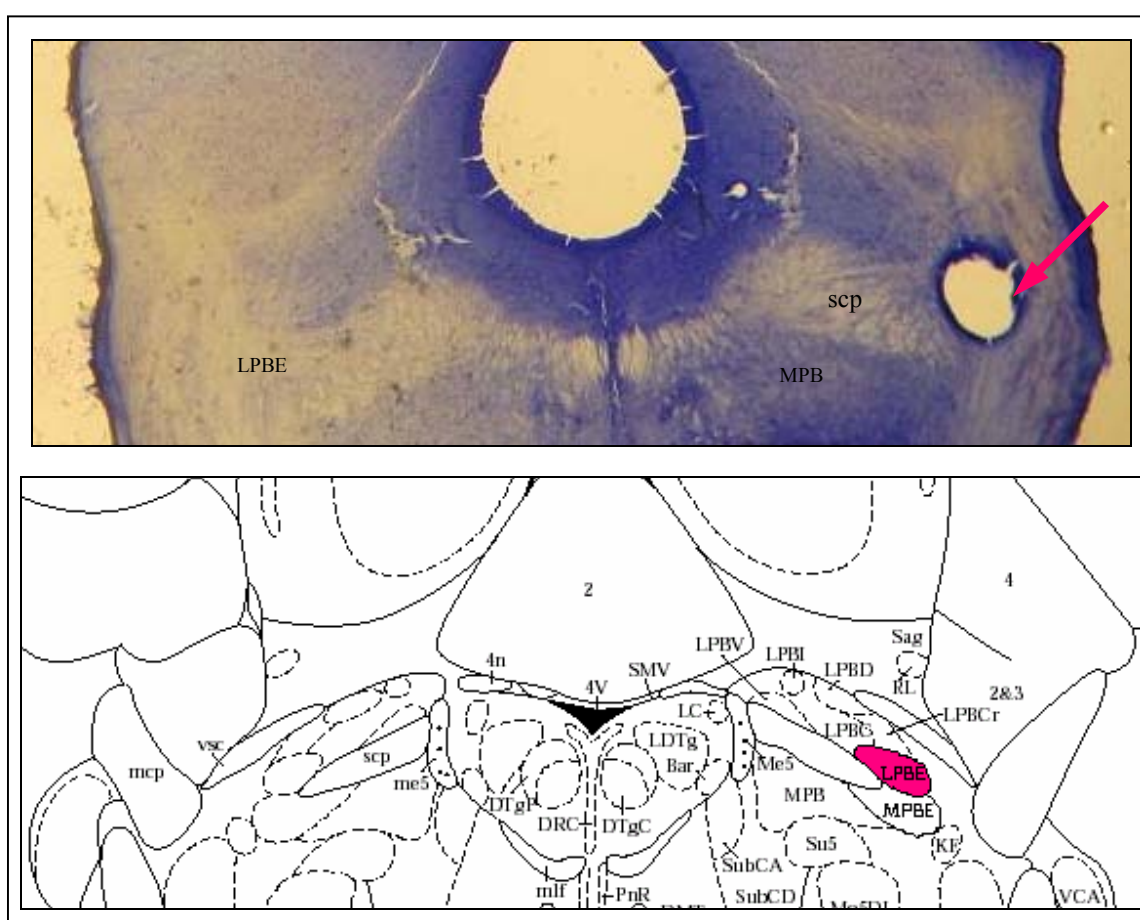


**Figura 34.** Test de Discriminación Simultánea. Este test se lleva a cabo una vez finalizado el periodo de adquisición (4 días) y consiste en la presentación de los dos estímulos gustativos de forma simultánea. El animal puede elegir voluntariamente la ingesta de cualquiera de ellos.

Este proceso de aprendizaje fue repetido de nuevo en cuatro sesiones experimentales más (dos ensayos). También durante el segundo Test de Discriminación Simultánea, los animales dispusieron durante 7 minutos de las dos buretas con los sabores Fresa y Coco, en la misma posición que habían sido presentadas durante los ensayos de adquisición.

## HISTOLOGÍA.

Tras finalizar el experimento, los animales son perfundidos y sus cerebros extraídos para su análisis histológico siguiendo la técnica descrita en el Experimento 1. La localización del electrodo de estimulación fue verificada en el NPBE, como puede observarse en la siguiente fotografía (Figura 35).



**Figura 35.** Sección transversal del cerebro de un animal representativo del grupo “positivo” que muestra la localización del electrodo de estimulación intracerebral. El Núcleo Parabraquial Lateral Externo (LPBE) aparece coloreado en rosa en la lámina inferior. Abreviaturas: LPBE, Núcleo Parabraquial Lateral Externo; MPB, Núcleo Parabraquial Medial; scp, Pedúnculo Cerebeloso Superior.

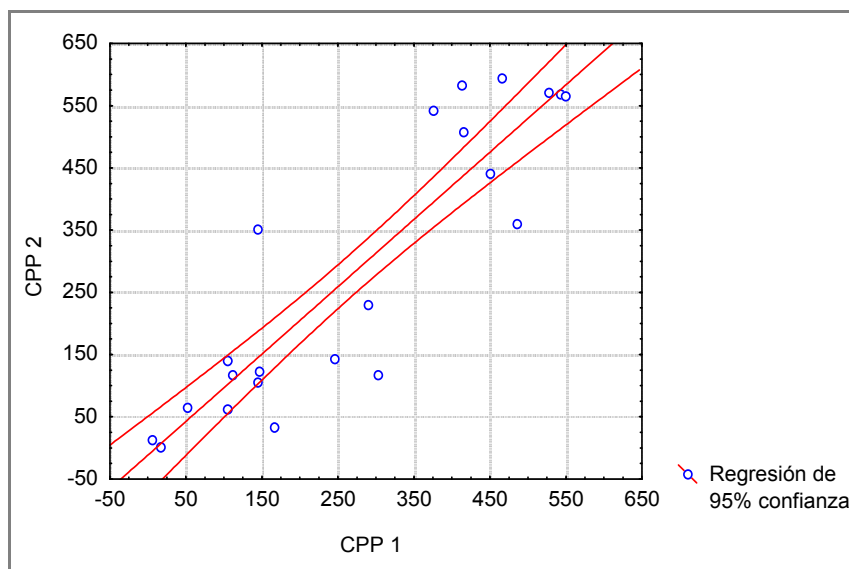
## ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

De los 26 animales implantados, tres de ellos fueron excluidos antes de comenzar las fases experimentales porque mostraban conductas de giro. Posteriormente otros dos, pertenecientes al grupo experimental “positivo” fueron descartados a causa del desprendimiento del implante, uno de ellos tras la prueba de condicionamiento de preferencia por un lugar, y el otro tras el primer Test de Discriminación Simultánea.

## RESULTADOS.

### **Fase 1:** *Condicionamiento concurrente de preferencia por un lugar (CPPc).*

Para el análisis estadístico de las dos sesiones de adquisición del condicionamiento concurrente de preferencia por un lugar, se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson, obteniendo una correlación significativa entre ambas ( $r = 0.8962$ ;  $p < 0.0001$ ) (ver Figura 36).



**Figura 36.** Matriz de correlación entre el tiempo de permanencia de los animales en el compartimento del laberinto asociado a la estimulación eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo, en cada una de las dos sesiones de condicionamiento de preferencias por un lugar.

Siguiendo el criterio establecido de distribución de los animales en el Experimento 1, se puede comprobar que el grupo “positivo” formado por 9 animales mostraron preferencias por la zona del corredor asociada a la estimulación (con un tiempo de permanencia medio de 497.89 s), el grupo “negativo” (formado por 11 animales) presentaba una estancia media en la zona estimulada de 98.136 s. y por último, el grupo “neutro” o indiferente constituido por 3 animales, mantenía una media de tiempo en la zona estimulada de 239.5 s.; aunque como se ha mencionado anteriormente, en este experimento los animales del grupo “negativo” y del grupo “neutro o indiferente” fueron utilizados como grupo “control” (tiempo medio de permanencia en la zona del laberinto asociada a la estimulación de 168.818 s).

**Fase 2:** *Aprendizaje Secuencial de Preferencias Gustativas.*

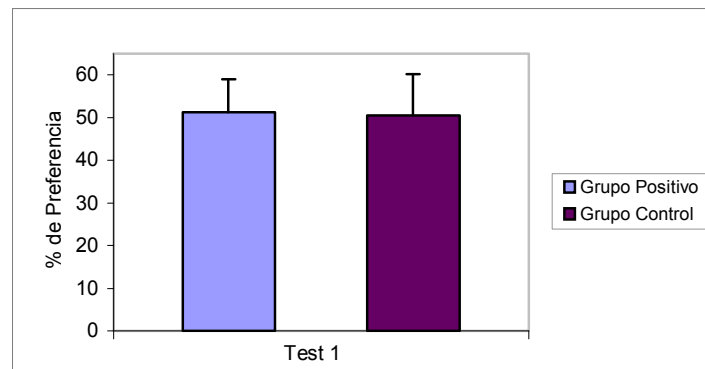
Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se estableció una proporción de preferencia (Bedingfield et al., 1998) hacia el sabor asociado a la estimulación, concretamente se dividió la cantidad en ml que los animales ingirieron del sabor asociado a la estimulación eléctrica el día del Test de Discriminación Simultánea, entre la cantidad total que consumieron de los dos estímulos gustativos, en esa misma prueba (ml ingeridos del sabor asociado a la estimulación + ml ingeridos del sabor no asociado a la estimulación), todo ello multiplicado por 100, es decir:

$$\text{Proporción de preferencia} = \frac{\text{Sabor st. (ml)}}{\text{Sabor st. (ml) + Sabor no st. (ml)}} \times 100$$

El análisis de los datos obtenidos en cada Test de Discriminación Simultánea se llevó a cabo estableciendo la proporción de preferencia mostrada por cada sujeto, y aplicando un Análisis de Varianza unifactorial entre grupos.

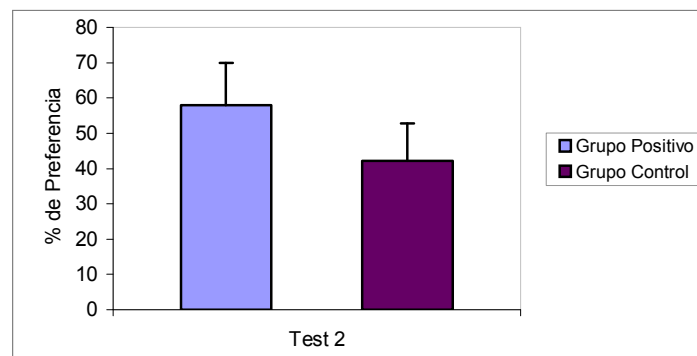
Los resultados obtenidos en el primer Test de Discriminación Simultánea permiten concluir que no existen diferencias significativas entre los grupos a partir de la proporción de preferencia por el sabor manifestada por los sujetos ( $F_{(1,20)} = 0.0026$ ;  $p < 0.959$ ) (Figura 37).





**Figura 37.** Porcentaje de preferencia por el sabor asociado a la estimulación eléctrica del NPBl [Sabor asociado a la estimulación del NPBl / (Sabor asociado a la estimulación + Sabor no asociado a la estimulación) x 100]; obtenido en el grupo experimental “positivo” y en el grupo “control” en el Test 1 de Discriminación Simultánea, en una tarea de aprendizaje gustativo secuencial.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el segundo Test de Discriminación Simultánea muestra que incluso aumentando el número de ensayos de adquisición, no se producen diferencias entre los grupos con respecto a la preferencia mostrada por los animales ( $F_{(1, 19)} = 0.754$ ,  $p < 0.396$ ) (Figura 38).



**Figura 38.** Porcentaje de preferencia por el sabor asociado a la estimulación eléctrica del NPBl [Sabor asociado a la estimulación del NPBl / (Sabor asociado a la estimulación + Sabor no asociado a la estimulación) x 100], obtenido en el grupo experimental “positivo” y en el grupo “control” en el Test 2 de Discriminación Simultánea, en una tarea de aprendizaje gustativo secuencial demorado.

## **DISCUSIÓN.**

Este estudio demuestra que la estimulación eléctrica intracerebral del NPBe no logra inducir preferencias gustativas cuando se utilizan tareas de discriminación a largo plazo o demoradas.

En cualquier caso, este resultado no parece depender de la técnica empleada para inducir las preferencias gustativas, es decir, la estimulación eléctrica intracerebral, ya que este procedimiento se había mostrado eficaz en otros estudios, por ejemplo, el Experimento 1 llevado a cabo en esta Tesis y durante la propia fase de condicionamiento espacial de este experimento.

Este resultado negativo no puede explicarse en función del número de ensayos de adquisición ya que en este experimento se duplicó con respecto a lo habitual para el establecimiento del aprendizaje gustativo (Agüero, 1990; Cubero, 1995; Mediavilla et al., 2000; Zafra, 2000; Zafra et al., 2002; Simón, 2003...).

Sin embargo, estos resultados si parecen compatibles con estudios anteriores en los que las lesiones del NPBe no afectan al aprendizaje de aversiones o preferencias gustativas cuando se utilizan procedimientos demorados, pero si interrumpe el aprendizaje cuando se lleva a cabo en tareas no demoradas (procedimientos a corto plazo o concurrentes). (Mediavilla et al., 2000; Zafra et al., 2002).

En fin este estudio parece sugerir que el NPBe no estaría implicado en el establecimiento de preferencias gustativas cuando la tarea de aprendizaje introduce demoras entre la presentación del estímulo gustativo y la estimulación eléctrica intracerebral (procedimientos a largo plazo o secuenciales). Los resultados obtenidos en este y otros estudios previos sugieren por el contrario una implicación de este subnúcleo en tareas de aprendizaje de tipo no demorado, posibilidad que será examinada en el siguiente experimento, a través de pruebas de discriminación gustativa que implican aprendizajes con características implícitas (contigüidad).

## **EXPERIMENTO 3: Preferencias gustativas inducidas por estimulación eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo en tareas de discriminación en contigüidad.**

---

### **MÉTODO.**

#### **SUJETOS.**

En este experimento se utilizaron 40 ratas macho Wistar, suministradas por el Estabulario de la Universidad de Granada, cuyo peso al inicio del experimento osciló entre 280 y 320 g. A su llegada al laboratorio, fueron distribuidas aleatoriamente en dos grupos, un grupo experimental (con electrodo intracerebral) formado por 27 animales y un grupo “control” (con falso implante, es decir sólo con el electrodo “masa” o de referencia) de 13 ratas.

Hasta el inicio del protocolo experimental, los animales se mantuvieron en el laboratorio en las mismas condiciones generales descritas en el apartado de Método del Capítulo I.

#### **PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.**

El procedimiento quirúrgico fue idéntico al descrito en el experimento anterior, aunque en este caso el grupo “control” carece de electrodo intracerebral y sólo dispone del electrodo “masa” o de referencia que fue implantado sobre la superficie del cráneo, siguiendo un procedimiento idéntico al empleado para los sujetos experimentales. Después de la intervención quirúrgica se estableció un periodo de recuperación de al menos 10 días, durante el cual los animales disponían de comida y agua ad libitum.

Tres de los animales experimentales con electrodo intracerebral tuvieron que ser excluidos por mostrar conductas de giro tras el procedimiento quirúrgico.

## **PROCEDIMIENTO CONDUCTUAL.**

Como en los casos anteriores, se determinaron los niveles de intensidad de la corriente eléctrica a utilizar durante el procedimiento conductual así como en el proceso de condicionamiento espacial llevado a cabo en el mismo laberinto en forma de corredor (Modelo 1) y que en esta ocasión oscilaron entre 60 y 170  $\mu\text{A}$ .

Como se ha indicado, todos los animales fueron sometidos a la prueba de condicionamiento de preferencia por un lugar (CPPc), aunque en el caso de los animales con falso implante, con los conectores de estimulación fijados, no recibieron estimulación eléctrica.

Siguiendo el criterio conductual establecido en el Experimento 1, resultaron tres grupos de animales de acuerdo con el tiempo de permanencia en la zona asociada a la estimulación: Un grupo “positivo” formado por 7 animales, un grupo “negativo” con 13 ratas y por último un grupo indiferente o “neutro” que contó inicialmente con sólo 4 animales. A este último grupo “neutro” se le añadieron los animales del grupo “control con falso implante” (13 animales), formando así un grupo con un total de 17 animales que a partir de este momento no recibieron estimulación eléctrica.

Estos animales se distribuyeron de la siguiente manera: A) Grupo “positivo” (7 animales) y su respectivo “control”/neutro (formado por 7 de los animales con falso implante y 2 “neutrales”). B) Grupo “negativo” (13 ratas) y un grupo “control”/ neutro formado por dos animales “neutrales” y 6 “controles con falso implante”. Todos los animales “controles” (con falso implante y “neutrales”), fueron distribuidos entre los grupos de manera aleatoria.

## **EXPERIMENTO 3 A: Aprendizaje de preferencias gustativas.**

---

### ***FASE 1: APRENDIZAJE DE PREFERENCIAS GUSTATIVAS.***

#### *Fase de Preentrenamiento.*

El proceso de adaptación seguido fue idéntico al descrito en el Experimento 2 (Pág. 126). Los animales fueron privados de agua, a la que sólo podían acceder durante 10 minutos en la primera sesión y 7 minutos en la segunda. Además recibían 14 g. de comida después de la ingesta de agua.

#### *Aprendizaje de Preferencias Gustativas.*

También al igual que en el experimento anterior, las sesiones experimentales comenzaban con la fijación de los correspondientes conectores de estimulación eléctrica intracerebral, después de comprobar que los implantes se mantenían en perfectas condiciones.

El procedimiento seguido para la inducción de preferencias gustativas fue el siguiente: Se presentan en días alternos, durante 7 minutos, dos estímulos gustativos novedosos y neutros, con sabor a "Fresa" y a "Coco". Uno de estos estímulos era seguido inmediatamente después por la estimulación eléctrica del NPBe durante 10 minutos (balanceando tanto la posición como el orden de presentación), mientras que el otro estímulo fue asociado a la "no estimulación" (ver Esquema 2 para obtener más detalles).

El quinto día se ofrecen a cada animal, durante 7 minutos, las dos buretas simultáneamente con los estímulos gustativos, Fresa y Coco (*Test de Discriminación*

*Simultánea*). La posición que ocupa cada sabor es la misma que la utilizada durante el aprendizaje.

Transcurridas 6 horas desde el Test de Discriminación Simultánea, los animales fueron sometidos a un Test de Inversión, que consistió en la presentación de las dos buretas con los estímulos gustativos Fresa y Coco, durante 7 minutos, pero situadas ahora en la posición (derecha/ izquierda) opuesta a la presentada durante el entrenamiento, es decir, la bureta con Fresa se colocó a la derecha y la de Coco a la izquierda, registrando la ingesta realizada en cada caso.

|                       | Sesión 1                       | Sesión 2                           | Sesión 3   | Sesión 4   | TEST  |
|-----------------------|--------------------------------|------------------------------------|------------|------------|---|
| Mítad de los animales | FRESA (izda.)<br>(7 min.)<br>+ | COCO (dcha.)<br>(7 min.)<br>+      | = Sesión 1 | = Sesión 2 | FRESA (izda.)<br><br>COCO (dcha.)<br><br>7 min. |
| Mítad de los animales | ESTIMULACIÓN<br>(10 minutos)   | NO<br>ESTIMULACIÓN<br>(10 minutos) |            |            |   |
| Mítad de los animales | FRESA (izda.)<br>(7 min.)<br>+ | COCO (dcha.)<br>(7 min.)<br>+      | = Sesión 1 | = Sesión 2 | FRESA (izda.)<br><br>COCO (dcha.)<br><br>7 min. |
| Mítad de los animales | ESTIMULACIÓN<br>(10 minutos)   | NO<br>ESTIMULACIÓN<br>(10 minutos) |            |            |   |

**Esquema 2.** Diagrama que muestra el procedimiento conductual llevado a cabo en el Experimento 3 en el cual la estimulación eléctrica (ST) del NPBe es asociada a un estímulo gustativo, Fresa o Coco, balanceando tanto el estímulo asociado a la estimulación como la posición que ocupa (izquierda; derecha), en una tarea de discriminación gustativa en contigüidad inter-estimular.

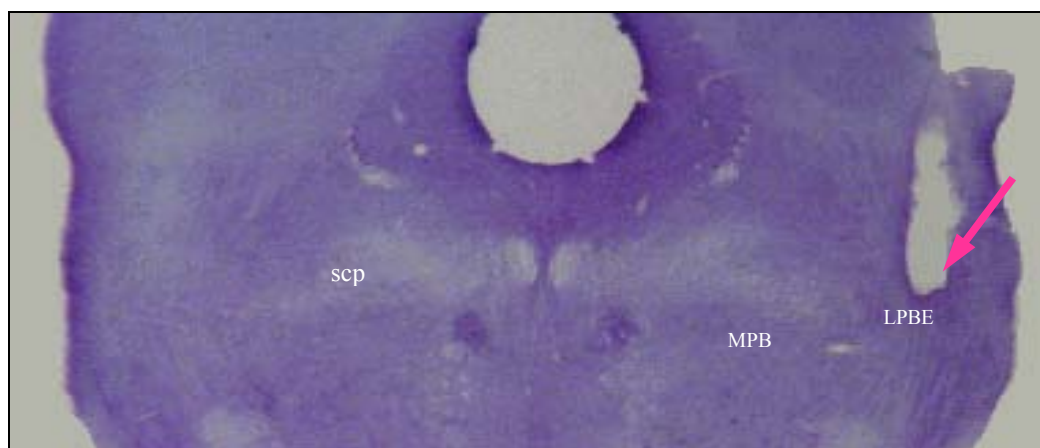
## ***FASE 2: INDUCCIÓN DE AUTOESTIMULACION ELÉCTRICA INTRACEREBRAL.***

Trascurrida una semana desde la última fase conductual, los animales fueron sometidos a un procedimiento experimental estándar de AEIC (Hawkins et al., 1983; Cubero y Puerto, 2000; Simón, 2003) similar al descrito en el Capítulo I de esta Tesis Doctoral.

Al igual que durante el experimento anterior, se utilizó ruido blanco de fondo, durante todo el procedimiento conductual para evitar posibles sonidos imprevistos que pudieran interferir con el experimento.

## **HISTOLOGÍA.**

Concluida la fase experimental los animales fueron perfundidos y el tejido cerebral analizado histológicamente siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Experimento 1. En la Figura 39 se puede comprobar la zona ocupada por el electrodo de estimulación en uno de los animales del grupo “positivo” de este estudio.

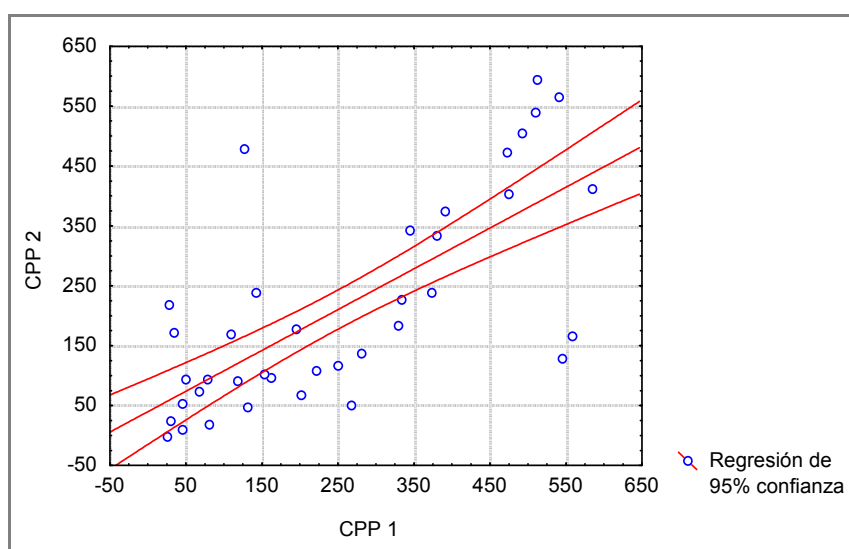


**Figura 39.** Sección transversal del cerebro de un animal representativo del grupo “positivo” que muestra la localización del tracto del electrodo. Abreviaturas: LPBE, Núcleo Parabraquial Lateral Externo; MPB, Núcleo Parabraquial Medial; scp, Pedúnculo Cerebeloso Superior.

## RESULTADOS.

### *Condicionamiento concurrente de preferencias por un lugar (CPPc).*

Para el análisis de los datos obtenidos en las dos sesiones de adquisición (llevadas a cabo en el Laberinto Modelo 1) se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson. Los resultados obtenidos indican que existe una correlación significativa entre las dos sesiones de condicionamiento de preferencia por un lugar ( $r = 0.7222$ ,  $p < 0.001$ ) (ver Figura 40).



**Figura 40:** Matriz de correlación entre el tiempo de permanencia de los animales en el compartimento del Laberinto Modelo 1 asociado a la estimulación eléctrica del NPBe en cada una de las dos sesiones de condicionamiento de preferencia por un lugar.

Aplicando el criterio conductual establecido anteriormente, los animales fueron asignados a tres grupos (“positivo”, “negativo” y “neutro”) en función del tiempo de permanencia en el compartimento asociado a la estimulación, durante las dos sesiones de condicionamiento. El grupo “positivo” presentó un promedio de permanencia en la zona asociada a la estimulación de 471.86 s.; el grupo “negativo” de 81.8 s., y el grupo indiferente o “neutro”, 357.125 s. Por último, los animales del grupo “control con falso implante” presentaron una media de permanencia en la zona estimulada de 244.77 s.

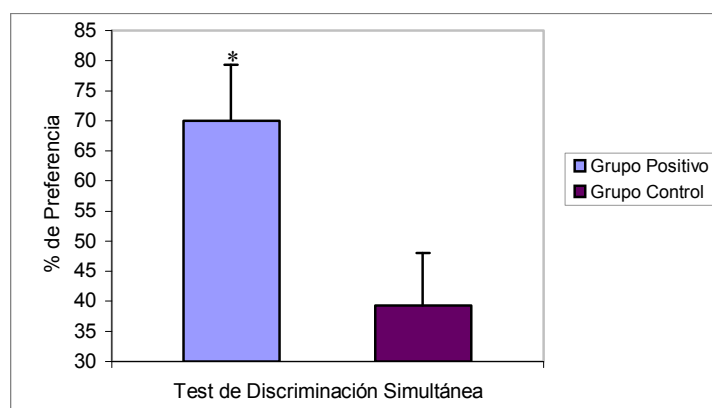


**Fase 1: Aprendizaje de preferencias gustativas.**

La proporción de preferencia que los animales mostraban por el sabor asociado a la estimulación (igual que en el Experimento 2 de esta Tesis) se estableció de la siguiente forma:

$$\text{Proporción de preferencia} = \frac{\text{Sabor st. (ml)}}{\text{Sabor st. (ml)} + \text{Sabor no st. (ml)}} \times 100$$

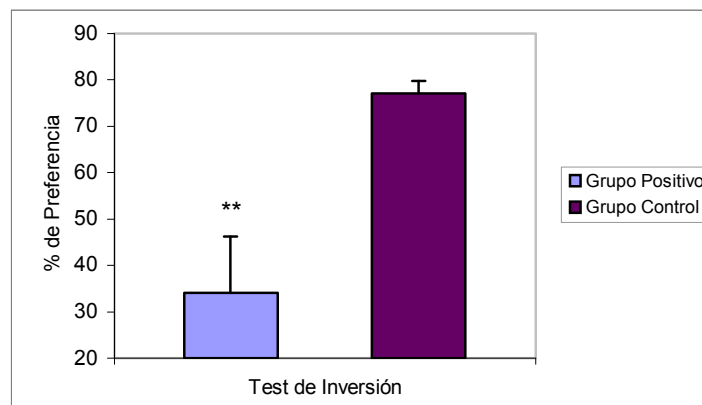
Los resultados obtenidos fueron analizados a través de un ANOVA unifactorial entre grupos, y muestran que la estimulación eléctrica del NPLe induce un comportamiento de preferencia significativamente mayor en el grupo “positivo” que en el grupo “control” ( $F_{(1, 14)} = 5.016$ ,  $p < 0.042$ ) (ver Figura 41).



**Figura 41.** Porcentaje de preferencia por el sabor asociado a la estimulación eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo, obtenido en el grupo experimental “positivo” (en color azul) y en el grupo “control” (en color morado) en el Test de Discriminación Simultánea, en una tarea de aprendizaje discriminativo en contigüidad inter-estimular. El asterisco (\*) muestra las diferencias entre grupos a un nivel de significación de 0.05.

A continuación se examinaron los datos obtenidos en el Test de Inversión mediante un ANOVA unifactorial entre grupos, en el que como variable dependiente se utilizó el porcentaje de preferencia por el sabor asociado a la estimulación. Los resultados muestran

que existen diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(1, 14)} = 13.25$   $p < 0.0027$ ), aunque en este caso, y como se puede comprobar en la Figura 42, los animales estimulados eléctricamente muestran una menor preferencia por el sabor asociado a la estimulación que los animales del grupo “control”.



**Figura 42.** Representación gráfica del porcentaje de preferencia por el sabor asociado a la estimulación obtenido en el grupo experimental “positivo” (en color azul) y en el grupo “control” (en color morado) en el Test de Inversión. Los asteriscos (\*\*) representan la diferencia entre los grupos a un nivel de significación de 0.01.

### ***Fase 2: Inducción de Autoestimulación Eléctrica Intracerebral (AEIC).***

Con respecto a la prueba de inducción de autoestimulación intracerebral, ninguno de los animales emitió respuestas operantes de forma espontánea y voluntaria, a pesar del intento de moldeamiento llevado a cabo.

## **DISCUSIÓN.**

A diferencia de lo sucedido en el experimento anterior, los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto que la estimulación eléctrica del núcleo Parabraquial Lateral Externo induce preferencias por los estímulos gustativos con los que es asociada, ahora en una tarea de aprendizaje discriminativo en contigüidad. Este resultado no puede ser relacionado con una preferencia inicial por alguno de los estímulos en cuestión ya que,

tanto los estímulos asociados con la estimulación como su posición, fueron balanceados a lo largo del experimento, además del hecho de que el grupo “control” no muestra preferencia alguna.

Estos resultados son compatibles con estudios recientes llevados a cabo por Zafra y colaboradores (2002), en los que se demuestra que la lesión de este subnúcleo impide el aprendizaje de preferencias gustativas, inducidas por la administración de nutrientes predigeridos reforzantes, en una tarea de aprendizaje de tipo concurrente o a corto plazo. Por tanto, parece que este núcleo puede estar implicado en el procesamiento del refuerzo tanto de índole natural (Zafra et al., 2002) como artificial (estimulación eléctrica intracerebral) pero siempre que la tarea implique contigüidad inter-estimular.

Con respecto a los resultados obtenidos en el Test de Inversión, esta prueba demuestra que los animales no pueden transferir el aprendizaje de preferencia adquirido previamente, a una nueva situación en la que cambian las condiciones (izquierda/ derecha) originalmente establecidas durante la adquisición. Ahora en una situación nueva los animales son incapaces de discriminar entre el estímulo asociado a la estimulación (reforzante) y el estímulo neutro (asociado a la no estimulación). Este resultado podría ser explicado en términos de un aprendizaje espacial o propioceptivo, o en otras palabras, cabe la posibilidad de que los animales durante el proceso de adquisición, hayan asociado el efecto reforzante de la estimulación a la posición de la bureta (izquierda/ derecha) o a su posición en el entorno espacial, y no al estímulo gustativo presentado. Sin embargo, con los datos obtenidos en este estudio no se puede descartar o confirmar esta posibilidad.

Por último, los resultados obtenidos durante la prueba de inducción de AEIC fueron de nuevo negativos. Este hecho abre la posibilidad de que el efecto reforzante generado mediante la estimulación del NPBe puede no ser idéntico al provocado habitualmente en otras regiones cerebrales y que sí sustentan conductas de autoestimulación.

## **EXPERIMENTO 3 B: Aprendizaje de aversiones gustativas.**

---

### ***FASE 1: APRENDIZAJE DE AVERSIONES GUSTATIVAS.***

#### *Fase de Preentrenamiento.*

Esta fase se desarrolló de igual forma a la descrita en el experimento 3 A.

#### *Fase de Aprendizaje Discriminativo.*

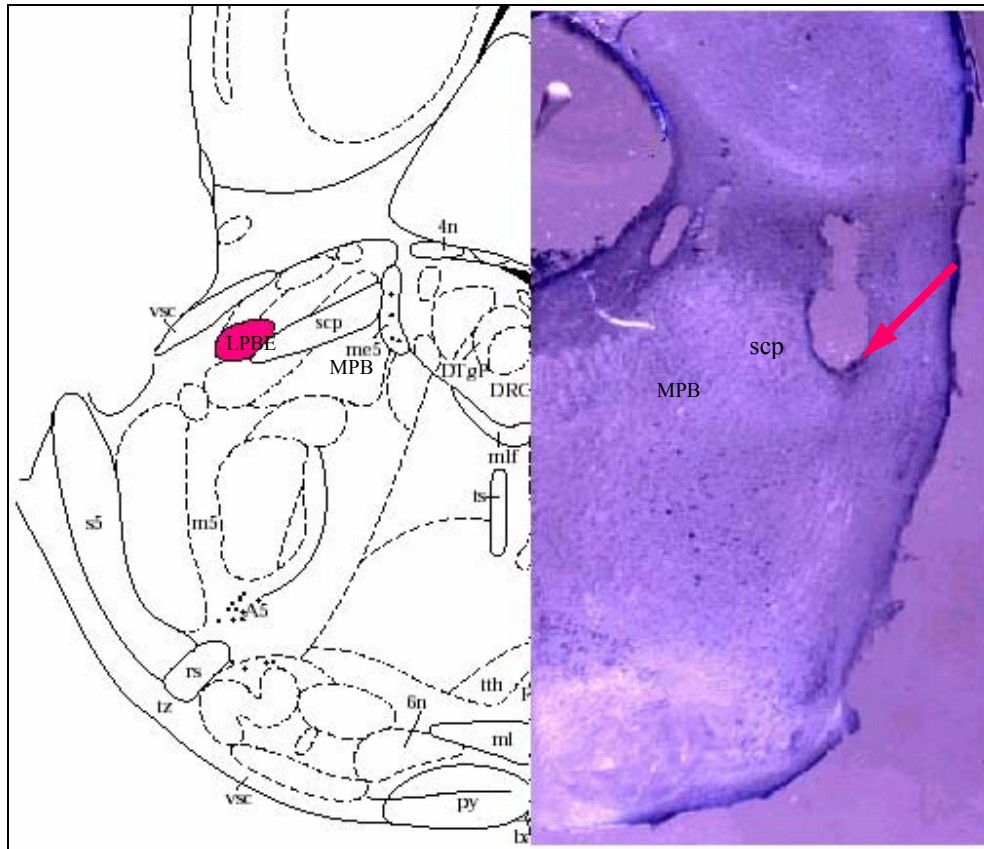
Esta fase se realizó siguiendo un procedimiento idéntico al descrito en el experimento 3 A (ver procedimiento en esquema 2), aunque en este caso tras el Test de Discriminación se volvió a repetir dicho procedimiento de manera que, el periodo adquisitivo se llevó a cabo en dos series repetidas con 2 ensayos cada una y sus correspondientes (dos) Test de Discriminación Simultánea:

Sesión 1- Sesión 2- Sesión 3- Sesión 4- Test de Discriminación Simultánea 1.  
Sesión 5- Sesión 6- Sesión 7- Sesión 8- Test de Discriminación Simultánea 2.

Por último se llevó a cabo un Test de Inversión, tras el segundo Test de Discriminación Simultánea.

### **HISTOLOGÍA.**

Una vez concluida la fase experimental los animales fueron sacrificados y se procedió al estudio histológico de las zonas cerebrales intervenidas siguiendo el procedimiento descrito en el Experimento 1, verificando de esta manera la posición ocupada por el electrodo, el NPble (ver Figura 43).

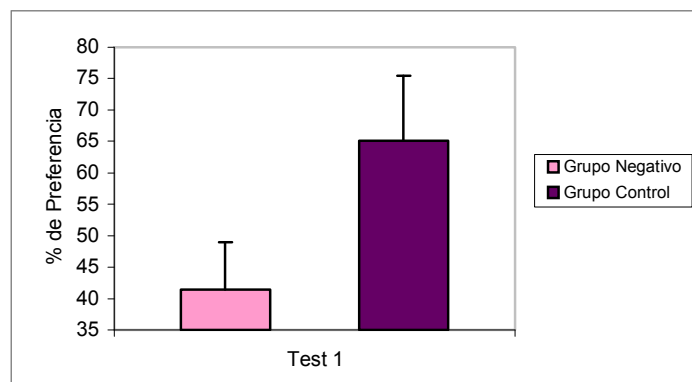


**Fotografía 43.** Sección transversal del cerebro de un animal representativo del grupo “negativo” que muestra la localización del electrodo. En la lámina de la izquierda aparece coloreado en rosa el Núcleo Parabraquial Lateral Externo. Abreviaturas: LPBE, Núcleo Parabraquial Lateral Externo; MPB, Núcleo Parabraquial Medial; scp, Pedúnculo Cerebeloso Superior.

## RESULTADOS.

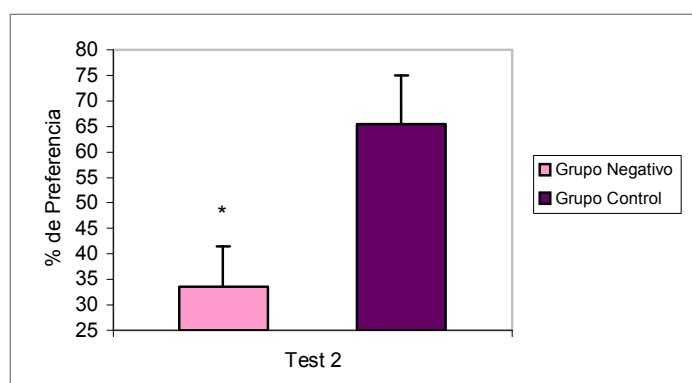
### ***Fase 1: Aprendizaje de Aversiones Gustativas.***

En el primer Test de Discriminación Simultánea los resultados obtenidos muestran una tendencia hacia la significación (que no es alcanzada) entre los grupos en cuanto a la preferencia mostrada por los animales por el estímulo gustativo asociado a la estimulación ( $F_{(1, 19)} = 3.22, p < 0.0885$ ). La Figura 44 muestra la proporción de preferencia por el “sabor estimulado” según cada grupo.



**Figura 44.** Representación gráfica del porcentaje de preferencia por el sabor asociado a la estimulación eléctrica del NPBl, manifestada por los animales del grupo “negativo” (en color rosa) y el grupo “control” (en color morado) en el primer Test de Discriminación Simultánea.

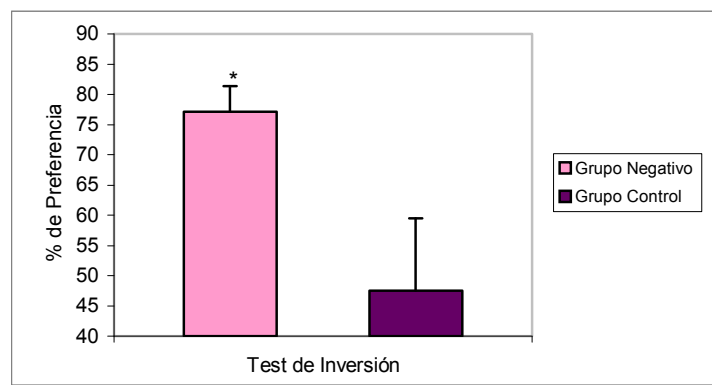
Por el contrario, el ANOVA de los datos obtenidos en el segundo Test de Discriminación Simultánea muestra que existen diferencias significativas entre los grupos “negativo” y “control” en la proporción de preferencia que éstos manifiestan ( $F_{(1,19)} = 5.77$ ;  $p < 0.027$ ). Los animales del grupo “negativo” muestran una reducción en la proporción de preferencia por el sabor asociado a la estimulación eléctrica del NPBl (ver Figura 45).



**Figura 45.** Representación gráfica del porcentaje de preferencia por el sabor asociado a la estimulación eléctrica del NPBl manifestada por los animales del grupo “negativo” (en color rosa) y el grupo “control” (en color morado) en el Test 2 de Discriminación Simultánea. El asterisco (\*) muestra las diferencias entre los grupos a un nivel de significación menor de 0.05.

Por último, el análisis de los datos obtenidos en el Test de Inversión, muestra que existen diferencias entre los grupos en cuanto a la proporción de preferencia mostrada por

los animales ( $F_{(1,19)} = 6.73$ ;  $p < 0.02$ ). En este caso, como puede comprobarse en la Figura 46, los animales del grupo “negativo” muestran una mayor preferencia por el sabor asociado a la estimulación.



**Figura 46.** Representación gráfica del porcentaje de preferencia por el sabor asociado a la estimulación del NPBL manifestada por los animales del grupo “negativo” (en color rosa) y el grupo “control” (en color morado). El asterisco (\*) muestra las diferencias entre los grupos a un nivel de significación menor de 0.02.

## DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la activación del Núcleo Parabraquial Lateral Externo mediante estimulación eléctrica intracerebral puede inducir aversión o evitación por los estímulos con los que es asociada. Una vez más puede afirmarse que es poco probable que este resultado sea debido a una aversión inicial hacia los estímulos gustativos empleados ya que el grupo “control” ingiere cantidades similares de ambos estímulos y la distribución de dichos estímulos con respecto a la estimulación ha sido previamente balanceada.

Por otra parte, cuando se modifican las condiciones establecidas durante la adquisición del aprendizaje (Test de Inversión) los animales se muestran incapaces para adaptar su conducta a las nuevas demandas. Los datos obtenidos en el Test de Inversión parecen sugerir que los animales han aprendido a asociar el efecto aversivo de la estimulación con una de las posiciones, más que con el sabor relacionado con la activación del PBL.

## **DISCUSIÓN GENERAL DEL CAPÍTULO II.**

Los resultados obtenidos en este estudio sobre la implicación del Núcleo Parabraquial Lateral Externo en procesos de aprendizaje discriminativo gustativo, demuestran la participación de este subnúcleo en el aprendizaje de índole aversivo (experimento 3 B) o apetitivo (experimento 3 A), siempre que los requisitos temporales se ajusten a la modalidad implícita/ contigüidad inter-estimular.

Los resultados obtenidos en el Experimento 2 ponen de manifiesto que incluso en el caso de que se duplique el número de ensayos de adquisición, la estimulación eléctrica del NPBe no logra inducir preferencias gustativas, si se utilizan tareas de aprendizaje discriminativo gustativo demorado/ secuencial. Este hecho es compatible con investigaciones realizadas en nuestro laboratorio que demuestran que las lesiones del NPBe no afectan al aprendizaje discriminativo gustativo aversivo (Mediavilla et al., 2000) o apetitivo (Zafra et al., 2002), cuando el proceso de adquisición utilizado es de tipo secuencial.

Este resultado negativo no puede explicarse en términos del procedimiento técnico empleado ya que la estimulación eléctrica intracerebral constituye un estímulo eficaz para inducir tanto preferencias (Cubero y Puerto, 2000; García Pérez et al., 2002; Simón et al., 2006) como aversiones (Gallo et al., 1988; Agüero et al., 1993b; Hurtado et al., 2006; Simón et al., 2007) hacia los estímulos con los que es asociada, ya sean de tipo gustativo o espacial.

Por el contrario cuando en el Experimento 3, se utiliza una modalidad de aprendizaje en contigüidad/ implícito, la activación eléctrica del NPBe pone de manifiesto el carácter reforzante de la estimulación, al preferir los animales, comparándolo con el grupo “control”, el estímulo gustativo asociado (Experimento 3 A). Por su parte en el grupo de animales “negativo”, la estimulación eléctrica induce una clara aversión hacia el sabor asociado a la estimulación, resultado similar al observado previamente en estos animales, en una tarea de CPPc (Experimento 3B).

Estos resultados podrían interpretarse inicialmente en términos de la activación de este área que incluye información gustativa. En efecto se han identificado en el Complejo



Parabraquial, neuronas gustativas primarias que responden a los aspectos cualitativos del estímulo gustativo (Yamada et al., 1990; Halsell y Frank, 1992; Yamamoto et al., 1994; Di Lorenzo y Monroe, 1997; Halsell y Travers, 1997; Nishijo y Norgren, 1997). También se han descrito células gustativas de carácter hedónico sensibles a los aspectos motivacionales (aversivo o apetitivo) o a la valoración innata o adquirida de la significación biológica de los estímulos gustativos y de sustancias químicas (Yamamoto, 1993; Yamamoto et al., 1994; Monroe y Di Lorenzo, 1995; Yamamoto y Sawa, 2000a; b). Por tanto, existe la posibilidad de que la estimulación eléctrica del NPBe pueda haber activado algunas de estas últimas células, de tipo 2 o hedónicas (Yamamoto et al., 1994; Yamamoto y Sawa, 2000a; b), las cuales imprimirían un sello hedónico al estímulo gustativo que provocaría un cambio en el valor inicial del estímulo asociado, haciéndolo más atractivo para el sujeto y permitiendo así la preferencia observada en el test de elección.

Sin embargo esta posibilidad parece poco probable ya que las lesiones del NPBe no interfieren con el procesamiento de la información gustativa. En efecto, a través de pruebas de aprendizaje discriminativo demorado, se ha comprobado que las lesiones del NPBe no interrumpen el establecimiento del aprendizaje secuencial gustativo (Zafra et al., 2002; Simón, 2003).

Por otra parte, aunque la administración intraoral de estímulos gustativos apetitivos para los animales como la sacarina, sacarosa o la policosa, generan inmunorreactividad en los subnúcleos del Parabraquial, incluido aunque en menor grado, el subnúcleo Lateral Externo (Yamamoto et al., 1994; Yamamoto y Sawa, 2000a; b), la actividad celular provocada en este subnúcleo es mayor, cuando el estímulo gustativo administrado posee efectos viscerales post-ingestión lo cual sugiere que el marcaje observado en el NPBe puede deberse más a un efecto visceral que gustativo (Yamamoto y Sawa, 2000b).

Cabe la posibilidad por tanto, de que la estimulación eléctrica del NPBe haya podido actuar como sustituto adecuado de estímulos viscerales y/ o de sus consecuencias motivacionales tanto de carácter aversivo como reforzante: Así, investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio, han demostrado que la estimulación eléctrica de estructuras como la Corteza Insular o el Área Postrema, puede inducir preferencias (Cubero y Puerto, 2000; Simón et al., 2007) o aversiones gustativas (Gallo et al., 1988; Agüero et al., 1993b; Hurtado et al., 2006; Simón et al., 2007), según los casos. De hecho, numerosas investigaciones han demostrado que el NPBe constituye uno de los primeros relevos anatómicos implicados en el procesamiento de la información de visceral (Herman y

Rogers, 1985; Lança y Van der Kooy, 1985; Herbert et al., 1990; Moga et al., 1990; Bernard et al., 1991; 1993; Halsell, 1992; Kobashi et al., 1993; Light et al., 1993; Alden et al., 1994; Jia, et al., 1994; Slugg y Light, 1994; Saper, 1995b; De Lacalle y Saper, 2000; Sowards, 2004), y mas concretamente de la información visceral mediada neuralmente (Fulwiler y Saper, 1984; Yamamoto et al., 1994; Sakai y Yamamoto, 1997; Wang et al., 1999; Karimnamazi et al., 2002). Estudios llevados a cabo con técnicas de neuro-imagen muestran activación en el NPble tras la estimulación eléctrica de las ramas aferentes del nervio Vago (Saleh y Cechetto, 1993; Gieroba y Blessing, 1994). Lo mismo sucede tras la administración de sustancias que estimulan receptores viscerales periféricos permitiendo una detección visceral rápida, por ejemplo el cloruro sódico hipertónico, etanol, drogas de abuso, glucosa, sacarosa, lactosa... (Yamamoto et al., 1992; Hochstenbach et al., 1993; Kobashi et al., 1993; Hayward y Felder, 1995; Sakai y Yamamoto, 1997; Wang et al., 1999; Yamamoto y Sawa, 2000a; b; Karimnamazi et al., 2002). Por último, se ha comprobado que la presencia de nutrientes en el intestino junto con la liberación de hormonas como la colecistoquinina generan señales que son procesadas vía vagal (Ritter et al., 1992a) y también por el NPble (Li y Rowland, 1995).

De acuerdo con los datos presentados en este Capítulo así como los de otros autores, un factor que parece ser esencial es el intervalo inter-estimular. Arnould y Agmo (1999) demostraron que la infusión intragástrica de glucosa en una tarea de aprendizaje en contigüidad, induce preferencias por los índices contextuales con las que es asociada en una tarea de CPP, efecto que se elimina si se introduce una demora temporal inter-estimular de 15 minutos.

También se ha demostrado que el NPble está implicado en el procesamiento de la información visceral vagal aversiva provocada por la administración de distintos productos aversivos. Así, Mediavilla y colaboradores (2000), demostraron que la administración de cloruro sódico hipertónico asociada de forma concurrente a la ingesta de un estímulo gustativo, provoca una reducción significativa en la ingesta de dicho estímulo (aprendizaje interoceptivo), efecto puede ser eliminado al lesionar el NPble (Mediavilla et al., 2000). Resultados similares se han observado cuando se ha utilizado la administración periférica de morfina, comprobándose que la lesión de toda la región Lateral (incluyendo el Pble) interrumpe el aprendizaje, efecto que no se produce si se lesiona el NPB Medial o si se utiliza como estímulo intra-visceral el cloruro de litio (Bechara et al., 1993; Nader et al., 1996).

Esta región también ha sido implicada en el procesamiento de información visceral reforzante. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que la administración intragástrica de nutrientes reforzantes, induce una marcada preferencia por los estímulos gustativos con los que es asociada, en una tarea de aprendizaje concurrente; este efecto es interrumpido si se lesiona el NPBe (Zafra et al., 2002).

Por tanto, de acuerdo con los datos presentados, podría proponerse que la estimulación eléctrica del NPBe ha podido actuar como sustituto de un estímulo visceral neural, y/ o de sus consecuencias motivacionales (aversivas y/ o reforzantes según los casos), el cual tras ser asociado al estímulo gustativo con un procedimiento en contigüidad, provoca una reducción o aumento en su consumo; un efecto similar al observado en el aprendizaje interoceptivo aversivo o reforzante, respectivamente (Puerto et al., 1976a; b; Puerto y Molina, 1977; Le Magnen, 1990). Por otra parte existe la posibilidad de que los animales hubieran aprendido y almacenado la información a través de un mecanismo explícito que les permita transferir el conocimiento adquirido a nuevas situaciones estimulares. Para comprobar esta hipótesis, se llevó a cabo un Test de Inversión en el que se modificó la situación estimular (izquierda/ derecha) que se había utilizado durante el periodo de adquisición. Los resultados obtenidos muestran que los animales no son capaces de transferir el aprendizaje cuando se introducen modificaciones con respecto al contexto en el que se llevó a cabo el aprendizaje, lo cual sugiere que el NPBe solo formaría parte del circuito anatómico implicado en el aprendizaje implícito.

Investigaciones recientes han demostrado que en las pruebas de Inversión, tras la adquisición de un aprendizaje gustativo de tipo concurrente, los animales no logran transferir el aprendizaje adquirido, algo que si sucede en los aprendizajes secuenciales/ explícitos (Mediavilla et al., 2001). Los resultados obtenidos en este Capítulo muestran una tendencia de los animales a ingerir una mayor cantidad del estímulo gustativo situado en la posición espacial que, durante el condicionamiento fue asociada a la estimulación intracerebral. Cabe la posibilidad por tanto, de que los animales hayan aprendido en función de índices espaciales o propioceptivos (Arnould y Agmo, 1999).

En resumen, los resultados obtenidos en la presente investigación permiten proponer que el NPBe participa en procesos de adquisición concurrentes en los que los requisitos temporales de la tarea desempeñan un papel fundamental, de manera que en el caso de introducir demoras inter-estimulares el aprendizaje no es probable. Este hecho junto con la escasa flexibilidad demostrada en las pruebas de transferencia del aprendizaje, son

características propias de la adquisición de un conocimiento no declarativo o implícito (Petri y Mishkin, 1994; Reber et al., 1996). En cualquier caso, los resultados obtenidos en el Test de Inversión no son concluyentes, y serán necesarios nuevos estudios que permitan determinar si el NPBe participa en procesos de aprendizaje de tipo explícito.

Anatómicamente relacionado con el NPBe se encuentra el Córtex Insular (Fulwiler y Saper, 1984; Halsell, 1992; De Lacalle y Saper, 2000) cuya participación en el circuito formado con el Tronco Cerebral puede ser esencial para la adquisición y la manifestación del aprendizaje interoceptivo (Kiefer y Orr, 1992; Reilly et al., 1993; Yamamoto et al., 1993). Los siguientes capítulos de esta Tesis Doctoral se van a centrar en esta región cortical.



**CAPÍTULO III: CONSISTENCIA EN LAS  
AVERSIONES O PREFERENCIAS POR UN  
LUGAR INDUCIDAS MEDIANTE LA  
ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE LA CORTEZA  
INSULAR AGRANULAR POSTERIOR.**



## **EXPERIMENTO 4: Consistencia en las aversiones o preferencias por un lugar inducidas mediante la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular Posterior.**

---

La Corteza Insular es un área de tejido cortical, en la que de acuerdo con su organización citoarquitectónica y las conexiones anatómicas que mantiene (ver apartado de Anatomía y citoarquitectura de la Corteza Insular en el Capítulo de Introducción de esta Tesis Doctoral, pág. 74) pueden establecerse tres estratos en la dimensión dorsoventral: Granular, Disgranular y Agranular, aunque en algunas zonas existe cierto solapamiento. La región Granular se sitúa ventralmente a las áreas Somatosensoriales Primaria y Secundaria y de acuerdo con las conexiones que mantiene, ha sido considerada como una zona viscerosensorial (Cechetto y Saper, 1987; Ogawa et al., 1992; Augustine, 1996; Zhang y Oppenheimer, 2000). Por su parte el estrato Disgranular, más prominente a nivel rostral de la rodilla del Cuerpo Caloso, está considerado como el Córtex Gustativo de la rata (Benjamín y Akert, 1959; Yamamoto et al., 1980). Finalmente la zona Agranular, que ocupa la parte más caudal de la CI, limitando con el Córtex Piriforme (Cechetto y Saper, 1987), es considerada por algunos autores como una región fundamental en la percepción gustativa y de las señales viscerales asociadas con la ingesta de comida (Sewards y Sewards, 2001), así como con la información visceral de tipo general (Cechetto y Saper, 1987).

Desde una perspectiva comportamental y a partir de la información sensorial mencionada, en la CI pueden diferenciarse dos grandes áreas: Una porción Anterior, relacionada principalmente con el procesamiento gustativo-nutritivo (Cechetto y Saper, 1987; Yamamoto et al., 1989); y otra región Posterior, implicada en el procesamiento de la información de tipo visceral general (Cechetto y Saper, 1987; Ito, 1992, 1994, 1998; Zhang y Oppenheimer, 1997; King et al., 1999). Aunque recientes investigaciones sugieren que esta región posterior visceral (Ínsula Posterior) podría actuar modulando el procesamiento de la información gustativa que se produce en la CI Anterior (Ogawa y Wang, 2002).



Diversos estudios han relacionado también a la CI con el aprendizaje aversivo gustativo (AAG), tanto durante el proceso de adquisición como durante el periodo de retención (Cubero, 1995; Bures et al., 1998; Cubero et al., 1999; Sakai y Yamamoto, 1999; Escobar y Bermudez-Rattoni, 2000...). Así por ejemplo, los estímulos gustativos de carácter aversivo, originan una activación de la CI Anterior (Kinomura et al., 1994), y lo mismo que sucede con la percepción de la temperatura y del dolor (Zhang y Oppenheimer, 2000). Por ello se ha concluido que esta zona podría estar funcionalmente implicada en la discriminación de la intensidad de estímulos térmicos dolorosos, codificando gradualmente las distintas intensidades con las que se presenta un estímulo. De hecho, en seres humanos se ha observado un incremento gradual de su respuesta conforme aumenta la intensidad del estímulo (Peyron et al., 2000).

Simultáneamente la Corteza Insular ha sido relacionada con el efecto analgésico inducido por distintos tratamientos. Así ha sucedido en pacientes con cuadros de dolor neuropático crónico (Duncan et al., 1998). Se ha podido comprobar que la estimulación eléctrica del Tálamo Somatosensorial (Tálamo Ventroposterior Lateral y Medial; VPL/VPM) inducía un efecto analgésico que activaba la Corteza Insular Anterior. Burkey y colaboradores (1996) por su parte, han relacionado la CI, en este caso la zona Posterior Agranular, con el efecto analgésico de la morfina.

Todos estos datos han permitido pensar que la Ínsula podría estar implicada en la percepción consciente del dolor y en la discriminación de las cualidades afectivas de los estímulos nocivos a través, por ejemplo, de sus conexiones con el sistema límbico (Peyron et al., 2000). Así se ha propuesto que dentro de la Corteza Insular, el procesamiento de la información sensorial de los estímulos tanto somatosensoriales como gustativos, se llevaría a cabo en la región anterior, mientras que la valoración motivacional-afectiva se produciría en la porción posterior de la CI (Sewards y Sewards, 2001; 2002; Sewards, 2004).

Más aún, algunos autores consideran que la CI podría estar implicada en la valoración hedónica innata o aprendida de los estímulos gustativos (Yamamoto et al., 1989; Kiefer y Orr, 1992; Phillips et al., 1997; Yamamoto, 1998; Cubero y Puerto, 2000). Concretamente, Yamamoto y su grupo han demostrado que, al igual que en las estructuras del Troncoencéfalo, tales como el NTS o el Núcleo Parabraquial, en la Corteza Insular existen células que responden ante el valor hedónico de los estímulos gustativos (Yamamoto et al., 1989). De hecho, lesiones de la CI impiden el cambio en la valoración hedónica de positivo a negativo que se produce tras una tarea de AAG (Kiefer y Orr, 1992).

Por otra parte, se ha comprobado en nuestro laboratorio que la estimulación eléctrica de la CI Posterior induce preferencias por el estímulo con el que es asociada, en una tarea de discriminación gustativa (Cubero y Puerto, 2000). Inicialmente este efecto de la estimulación puede deberse a una activación de las neuronas gustativas que procesan la valoración hedónica de los estímulos gustativos, potenciándola (Yamamoto et al., 1989), pero también es posible un efecto sobre el procesamiento de la información motivacional-afectiva y visceral que se producen esta zona (De Couteau et al., 1997; Balleine y Dickinson 1998; 2000; Ragozzino y Kesner, 1999; Peyron et al., 2000; Sewards y Sewards, 2001; 2002; Sewards, 2004).

Por todo ello, en el presente estudio se pretende examinar si el efecto obtenido mediante la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Posterior está restringido específicamente a estímulos de tipo gustativo o por el contrario, se trata de un refuerzo más general que podría extenderse a otras situaciones estimulares como por ejemplo el aprendizaje espacial. Ahora se va a utilizar una tarea de condicionamiento de preferencia por un lugar (CPP), que como se ha demostrado en otros estudios y en el Experimento 1 de esta Tesis, es un procedimiento fiable para comprobar el efecto reforzante o aversivo de la estimulación eléctrica intracerebral o de cualquier otra intervención a nivel cerebral (Mucha et al., 1982; Vezina y Stewart, 1987; Tzschentke, 1998). Concretamente se utilizará un corredor de preferencia (Laberinto Modelo 1), donde tendrán lugar dos sesiones de condicionamiento. Posteriormente, se pretende confirmar y reproducir el efecto obtenido mediante un nuevo laberinto (Laberinto Modelo 2) y un nuevo contexto. Por último, también se comprobará si la Corteza Insular forma parte del circuito prefrontal de refuerzo general (McGregor y Atrens, 1991), utilizando para ello la técnica de autoestimulación eléctrica intracerebral en los mismos animales en los que se haya inducido preferencia por un lugar.

## **MÉTODO.**

### **SUJETOS.**

Los sujetos empleados fueron 19 ratas macho Wistar, suministradas por el Animalario de la Universidad de Granada cuyo peso oscilaba entre 280-360 g al inicio del estudio.

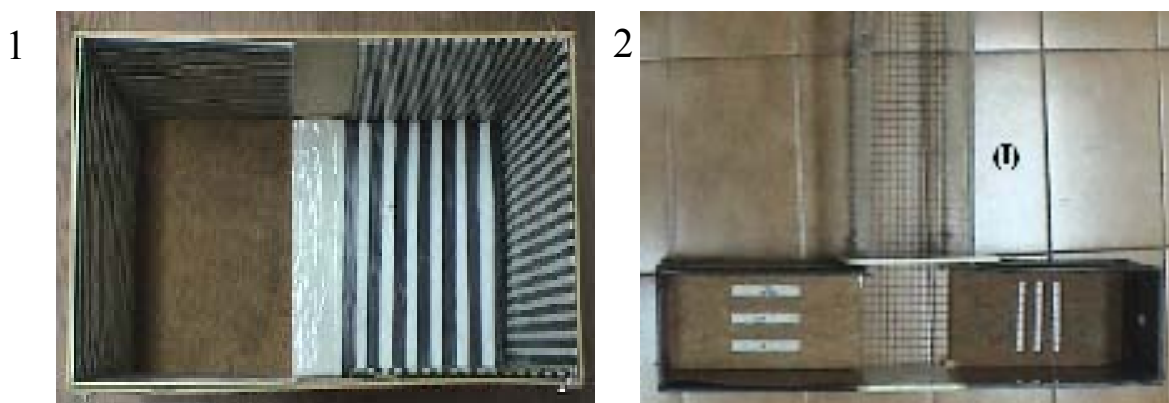
Hasta el inicio del protocolo experimental, los animales se mantuvieron en el laboratorio en las condiciones generales descritas en el apartado de Método del Capítulo I de esta Tesis Doctoral (Pág. 100).

## **INSTRUMENTOS.**

Al igual que en los experimentos anteriores, a su llegada al laboratorio, los animales fueron instalados en jaulas individuales de metacrilato. Las jaulas utilizadas así como el material necesario para el procedimiento quirúrgico son similares a los descritos en los experimentos anteriores (ver apartado de Instrumentos del Capítulo I).

El equipo empleado para administrar y monitorizar la corriente eléctrica (ver Figuras 21 y 22, Capítulo I), así como el necesario para llevar a cabo la histología, fue idéntico al descrito en los experimentos anteriores.

Para el condicionamiento de preferencia por un lugar llevado a cabo en la primera fase de este estudio, se utilizó el corredor de preferencia o laberinto Modelo 1 descrito en el apartado de Instrumentos del Capítulo I. En la fase 2, el laberinto utilizado fue el Laberinto en T o Modelo 2 (ver Figuras 23 y 24).



**Fotografías 23 y 24.** Vista desde arriba de los laberintos utilizados para el establecimiento del condicionamiento de preferencia por un lugar. A la izquierda (1) el corredor de preferencia (Modelo 1); y a la derecha (2) el Laberinto en T (Modelo 2). Abreviaturas: (I): Compartimento eliminado.

Finalmente y en relación con la inducción de autoestimulación eléctrica intracerebral, se empleó una caja de plexiglás transparente (50 x 55 x 60 cm.), con una palanca de presión en la pared frontal conectada al estimulador y a un contador de pulsos (ver apartado de Instrumentos del Capítulo I, Figura 25).

## **PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.**

Tras una semana de adaptación a las nuevas condiciones del laboratorio, los animales fueron sometidos a un proceso quirúrgico, idéntico al descrito en los experimentos anteriores, aunque en este caso el electrodo monopolar fue implantado en la CI Agranular Posterior [Coordenadas: AP = + 8.16; L = + 5.9; V = + 2.4; a partir del punto 0 interaural, según el atlas de Paxinos y Watson (1996)].

Transcurrido un periodo de recuperación de al menos 10 días, en el que los animales disponían de agua y comida libremente, se inició el periodo conductual.

## **PROCEDIMIENTO CONDUCTUAL.**

Como se indicaba, este periodo se inició una vez que los animales se recuperaron de la intervención quirúrgica, mientras tanto eran mantenidos en sus mismas jaulas de metacrilato individualizadas, con ciclos de luz oscuridad de 12/12 h, con comida y bebida ad libitum. Las pruebas conductuales se llevaron a cabo durante el periodo de luz. La temperatura de la habitación se mantuvo entre 20-24° C.

Así, durante todo el procedimiento conductual se empleó ruido blanco para evitar que posibles ruidos fortuitos pudieran alterar el comportamiento de los animales.

### ***FASE 1: CONDICIONAMIENTO CONCURRENTES DE PREFERENCIAS POR UN LUGAR (CPPc) EN EL LABERINTO CON FORMA DE CORREDOR (MODELO 1).***

*Fase de fijación de la intensidad de la corriente eléctrica apropiada.*

Este procedimiento se llevó a cabo 2 días antes del comienzo del condicionamiento espacial y para ello se siguió el mismo procedimiento utilizado en los experimentos

anteriores. Como entonces se establecieron los niveles de intensidad apropiados para cada animal, de forma que en ningún caso se manifestaran alteraciones motoras o respuestas de escape (Tehovnik, 1996). En este experimento, los niveles de intensidad oscilaron entre 100 y 600  $\mu\text{A}$ , aunque durante el procedimiento conductual los niveles de corriente se redujeron en un 25% (entre 75 y 450  $\mu\text{A}$ ), puesto que distintas pruebas con intensidad llevadas a cabo en nuestro laboratorio, habían mostrado una mayor tolerancia a estas intensidades reducidas cuando son administradas durante un largo periodo de tiempo.

### *CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIA.*

El procedimiento seguido consistió en la estimulación eléctrica concurrente de la Corteza Insular Agranular coincidiendo con la estancia voluntaria del animal en una de las zonas espaciales establecidas en el corredor de preferencia. Al igual que en los experimentos anteriores, se consideró que el animal estaba dentro de una de las zonas del laberinto cuando introducía la cabeza y las patas delanteras en ese área. La zona donde los animales iban a recibir la estimulación fue establecida de forma aleatoria antes de comenzar el procedimiento experimental y fue adecuadamente contrabalanceada. Así pues, a la mitad de los animales se les administró la estimulación eléctrica en una zona del laberinto y al resto en la otra.

El laberinto en corredor (Modelo 1) (ver apartado de Instrumentos, Figura 23) fue colocado en el centro de la sala, en posición Norte-Sur. El procedimiento fue el siguiente: cada animal era situado en la zona central del corredor al tiempo que se activaba un registro del tiempo. Durante 10 minutos, dos observadores contabilizaban el tiempo que el animal permanecía en uno u otro lateral. Este procedimiento se llevó a cabo en dos sesiones, pero sólo la segunda fue considerada como índice de aprendizaje y preferencia.

### ***FASE 2: CONDICIONAMIENTO CONCURRENTE DE PREFERENCIA POR UN LUGAR (CPPc) EN EL LABERINTO EN T (MODELO 2).***

Para asegurar y confirmar que los resultados obtenidos en el laberinto modelo 1 no fueron aleatorios, se repitió el proceso de condicionamiento utilizando un nuevo contexto espacial, un laberinto en T o Modelo 2 (ver apartado de Instrumentos, Figura 24). Ahora se modificaron las claves espaciales externas, colocando el laberinto en el centro del laboratorio pero en posición Este-Oeste. En este caso, y de modo análogo al experimento

anterior, el lugar donde los animales recibieron la estimulación fue contrabalanceado, de manera que la mitad de los animales recibieron estimulación en un lateral del laberinto y el resto en el otro.

### ***FASE 3: INDUCCIÓN DE AUTOESTIMULACION ELÉCTRICA INTRACEREBRAL.***

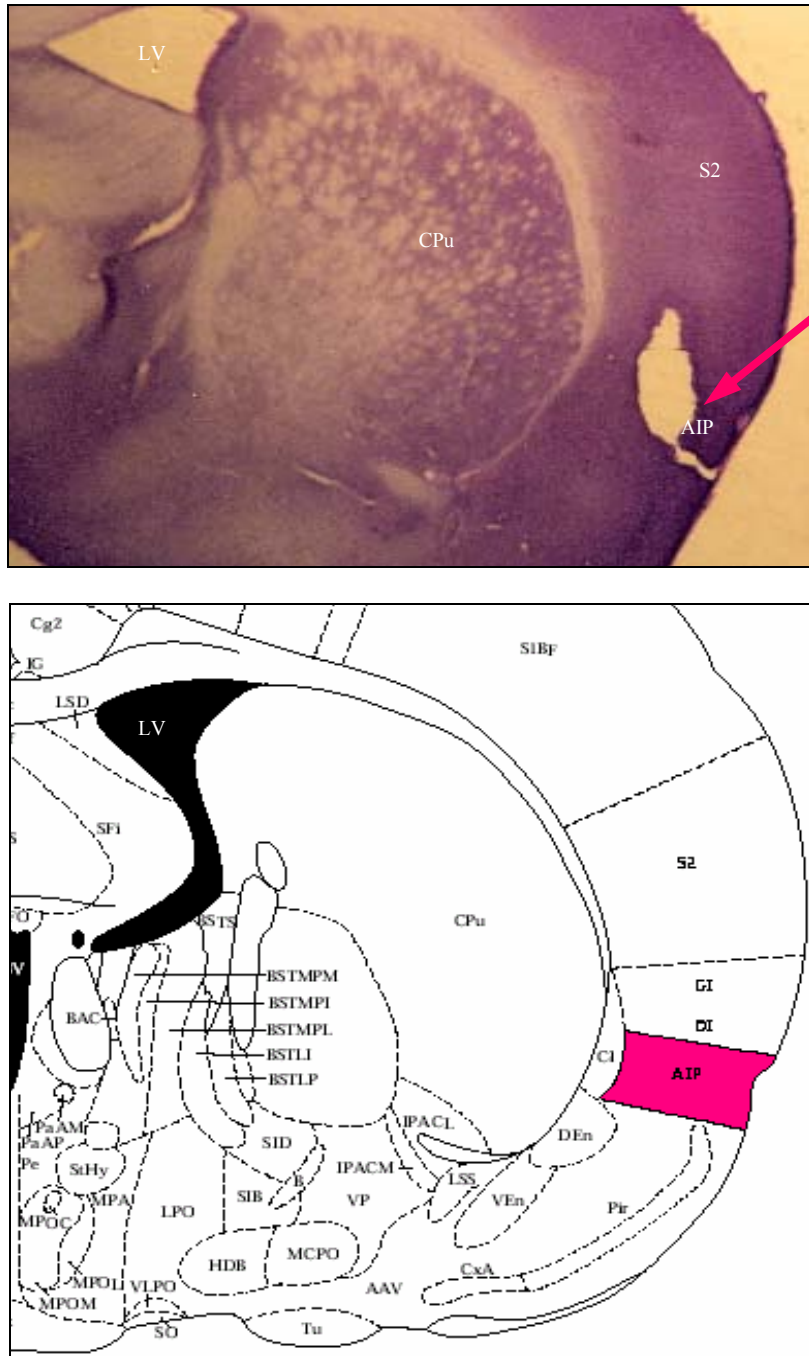
Estos animales implantados en la Corteza Insular Agranular, fueron sometidos a un procedimiento experimental estándar de AEIC, similar al descrito en los capítulos anteriores (Hawkins et al., 1983; Cubero y Puerto, 2000; Simón, 2003).

### **HISTOLOGÍA.**

Tras finalizar las pruebas conductuales, los animales recibieron una sobredosis de anestésico y se efectuó una pequeña lesión electrolítica en la zona donde estaba localizado el electrodo. Posteriormente, fueron perfundidos con suero salino y una solución de formol intra-cardíaco. Los cerebros fueron extraídos y conservados en paraformaldehído al 10% durante varios días para posteriormente ser seccionados en láminas coronales de 60 micras con un microtomo por congelación. La posición de los electrodos fue verificada utilizando una tinción con Violeta de Cresilo, siendo posteriormente fotografiada (ver Figura 47).

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

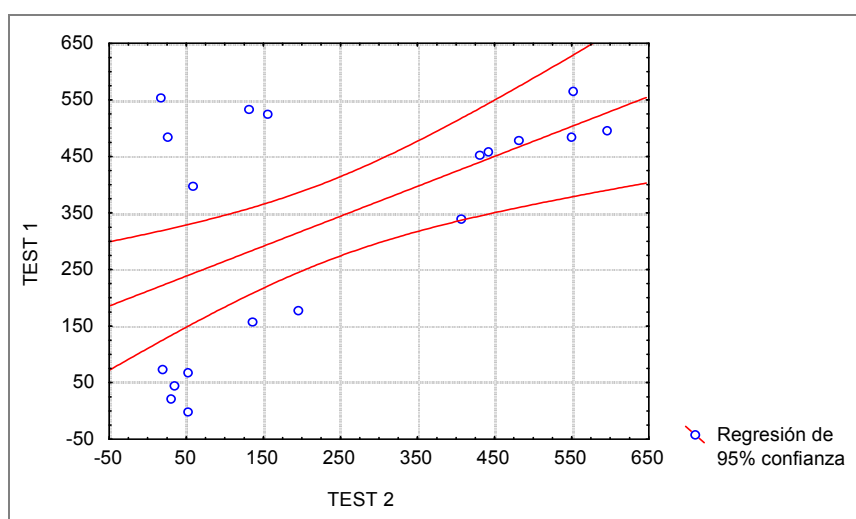
De acuerdo con lo indicado anteriormente, se consideraron como índices de aprendizaje los datos obtenidos en el segundo día de adquisición en la prueba de condicionamiento concurrente de preferencia por un lugar, tanto en el laberinto con forma de corredor (Modelo 1) como en el laberinto en T (Modelo 2). Estos datos fueron comparados utilizando el coeficiente de correlación de Pearson y un análisis de Cluster.



**Figura 47.** Fotografía que muestra una sección transversal del cerebro de un animal representativo del grupo “positivo” donde se comprueba la localización del electrodo en la Corteza Insular Agranular Posterior. La Corteza Insular Agranular Posterior (AIP) aparece coloreada en la lámina inferior. Abreviaturas: AIP: Corteza Insular Agranular Posterior; Cpu: Caudado Putamen; LV: Ventrículo Lateral; S2: Córtex Somatosensorial Secundario.

## RESULTADOS.

Los resultados obtenidos muestran una correlación positiva entre el segundo día de condicionamiento concurrente de preferencias por un lugar en el laberinto Modelo 1 y en el laberinto Modelo 2 ( $r = 0.548$ ;  $p = 0.015$ ). Lo que nos indica que el tiempo transcurrido por cada animal en la zona estimulada vs. no estimulada están significativamente correlacionados, es decir que el efecto de preferencia y evitación hacia un lugar inducido por la estimulación eléctrica de la CI no es un resultado aleatorio (ver Figura 48).



**Figura 48.** Representación gráfica de la correlación entre el tiempo (expresado en segundos) transcurrido por los animales el segundo día de condicionamiento espacial, en la zona del laberinto Modelo 1 (Test 1) y del laberinto Modelo 2 (Test 2), asociada a la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular Posterior.

Mediante un análisis de Cluster en cada uno de los casos (segundo día de CPP de cada laberinto), se obtuvieron 3 grupos de animales bien diferenciados. Un grupo de 7 animales con una clara preferencia por la zona donde recibió estimulación de la Corteza Insular (con una media de 480.785 s) ( $r = 0.753$ ;  $p = 0.050$ ), otro grupo de 7 sujetos que prefirió la zona no estimulada (media de 76 s en la zona estimulada) ( $r = 0.869$ ;  $p = 0.011$ ) y finalmente un tercer grupo ( $n = 5$ ), no definido o “neutral” (por lo que se comprueba que no existe correlación entre los resultados de ambos laberintos;  $r = 0.196$ ;  $p = 0.75$ ). Esta misma distribución de los animales la podemos obtener si aplicamos el criterio conductual establecido anteriormente (Experimento 1) (Pág. 106).



Con respecto a la prueba de inducción de autoestimulación intracerebral, no pudo lograrse que ninguno de estos animales consiguiera aprender a emitir respuestas operantes de forma espontánea y voluntaria, a pesar del periodo de moldeamiento utilizado.

## **DISCUSIÓN.**

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular Posterior puede generar efectos motivacionales consistentes:

Así una parte de los animales, muestran una marcada preferencia por los estímulos o índices espaciales (somatosensoriales y/ o visuales) asociados con la activación eléctrica simultánea de esta región cerebral (grupo “positivo”).

Otros animales, por su parte, muestran reacciones consistentes de aversión o evitación del lugar asociado con la estimulación eléctrica intracerebral (grupo “negativo”).

Y por último, existe un tercer grupo en el que la estimulación eléctrica de la CI no provoca una respuesta definida de evitación o aproximación hacia el lugar asociado a la estimulación, mostrando una conducta alternante o de indiferencia (grupo “neutro”).

Así pues, estos resultados no parecen ser aleatorios, ya que la repetición del procedimiento de CPP concurrente, modificando los parámetros estimulares internos (laberintos diferentes) y externos (distinta posición del laberinto en la sala) no impide que se reproduzcan las conductas de preferencias o evitación de la zona asociada a la estimulación.

Por su parte, la ausencia de efectos positivos en la prueba operante de autoestimulación intracerebral, sugiere que las preferencias espaciales inducidas a través de la estimulación eléctrica de la CI Posterior no podrían ser explicadas como resultado de la activación del circuito prefrontal de refuerzo general (McGregor y Atrens, 1991). De hecho, estudios llevados a cabo mediante técnicas inmuno-histoquímicas en los que se examinó el marcaje de células en las distintas regiones cerebrales activadas por la

autoestimulación intracerebral del Hipotálamo Lateral, no incluyen una activación de la CI (Arvanitogiannis et al., 1997; Flores et al., 1997; Hunt y McGregor, 1998), a pesar de la conexiones anatómicas existentes (Öngur et al., 1998; Dupont et al., 2003).

Sin embargo, aunque los resultados obtenidos en este y otros estudios (Cubero y Puerto, 2000) sugieren que el efecto reforzante inducido por la activación eléctrica de la CI Posterior no es debido a que esta estructura sustente conductas de autoestimulación, con los datos disponibles por el momento, no se puede descartar definitivamente la posibilidad de que la estimulación eléctrica de la Corteza Insular no haya generado preferencias espaciales, a través de la activación de alguno de los componentes de un circuito de refuerzo general.

Con respecto a las preferencias y aversiones hacia un lugar obtenidas en este experimento mediante la estimulación eléctrica de la CI, se podría decir que además de en el procesamiento de la información gustativa, visceral y nociceptiva (Cechetto y Saper, 1987; Yamamoto et al., 1989; Kinomura et al., 1994; Augustine, 1996; McDonald, 1998; Francis et al., 1999; Gautier et al., 1999; King et al., 1999; Small et al., 1999; Peyron et al., 2000; Treede et al., 2000; Zhang y Openheimer, 2000; Swards y Swards, 2002; Dupont et al., 2003; Swards, 2004...), la Corteza Insular interviene también en procesos adquisitivos de tipo reforzante y/ o aversivo, estableciendo asociaciones con estímulos somatosensoriales tales como la textura del suelo, con aspectos visuales (por ejemplo las paredes de las distintas zonas de los laberintos son distintas), o espaciales, originando conductas de aproximación o evitación hacia dichos estímulos, según los casos.

Más aún, estudios anatómicos, conductuales y neurofisiológicos previos han demostrado que la CI participa en el procesamiento de la información somatosensorial, tanto inocua como nociceptiva (Augustine, 1996; Chikama et al., 1997; Hanamori et al., 1998; Ito, 1998; McDonald, 1998; Zhang et al., 1999; Peyron et al., 2000; Treede et al., 2000; Zhang y Oppenheimer, 2000; Ogawa y Wang, 2002; Peyron et al., 2002; Swards y Swards, 2002; Wise et al., 2002; Cobos et al., 2003; Dupont et al., 2003; Inui et al., 2003...). Así, investigaciones llevadas a cabo con técnicas lesivas, demuestran la implicación de la Corteza Insular Posterior en distintas tareas de aprendizaje espacial (Bermúdez-Rattoni et al., 1991; Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991; Nerad et al., 1996). Concretamente, Nerad y colaboradores (1996) comprobaron que la lesión de la Corteza Insular Posterior en ratas, bloqueaba la adquisición del aprendizaje en una tarea de

localización espacial (el laberinto acuático de Morris), no observándose este resultado cuando la lesión se localizaba en la región anterior.

Sin embargo, también existe evidencia a favor de la implicación de la CI en el procesamiento de la información gustativa, aunque principalmente de su región anterior (Yamamoto et al., 1984; Yamamoto et al., 1985 b,c; Yamamoto et al., 1988a; Yamamoto et al., 1989; Kiefer y Orr, 1992; Scott et al., 1994; Norgren, 1995; Saper, 1995; Augustine, 1996; Phillips et al., 1997; Yamamoto, 1998; Yasoshima y Yamamoto, 1998; Cubero y Puerto, 2000; Hayama y Ogawa, 2001; Sowards y Sowards, 2001...). A través de técnicas de neuro-imagen se ha podido comprobar la activación de la Corteza Insular Anterior en presencia de estímulos gustativos (Kinomura et al., 1994; Francis et al., 1999; Gautier et al., 1999; Small et al., 1999) o en tareas de discriminación gustativa (Augustine, 1996). Pacientes con lesiones en la CI rostro-dorsal muestran déficits en estas mismas tareas de discriminación gustativa así como en la detección de la intensidad de estos sabores; aunque esto no ocurre cuando la lesión se localiza en la CI Posterior (Pritchard et al., 1999).

Diversos estudios neurofisiológicos han mostrado la existencia de células gustativas en la CI, aunque tanto las células relacionadas con el procesamiento de la cualidad sensorial discriminativa del estímulo gustativo (Yamamoto et al., 1984; Yamamoto et al., 1985 b,c; Yamamoto et al., 1988a; Yamamoto et al., 1989; Scott et al., 1994; Augustine, 1996; Yasoshima y Yamamoto, 1998; Hayama y Ogawa, 2001) como las células implicadas en los aspectos hedónicos o de valoración innata o adquirida de la significación biológica de estos estímulos (Yamamoto et al., 1985 b,c; Yamamoto et al., 1989; Yasoshima y Yamamoto, 1998), estarían localizadas principalmente en la porción Granular y Disgranular de la CI Anterior (Yamamoto et al., 1985 b,c; Yamamoto et al., 1989; Yasoshima y Yamamoto, 1998; Hayama y Ogawa, 2001). En menor medida también se han identificado neuronas sensibles al sabor en la Ínsula Agranular (Norgen, 1995; Hanamori et al., 1998; King et al., 1999; Ogawa y Wang, 2002), situándose de manera entremezclada con células mecano y termo-receptivas (Norgen, 1995).

Utilizando técnicas lesivas se ha intentado disociar funcionalmente entre distintas áreas de la Corteza Insular, y así se ha comprobado que la zona Anterior-Central del Córtex Insular, pero no la región Posterior, podría desempeñar un papel fundamental en la adquisición y/ o retención del aprendizaje de aversiones gustativas (Cubero, 1995; Nerad et al., 1996). La región Central-Posterior, por su parte, sería relevante en el aprendizaje espacial (Nerad et al., 1996), sin afectar a la adquisición del aprendizaje aversivo gustativo

(Cubero, 1995; Nerad et al., 1996). No obstante, dadas las abundantes aferencias que la Corteza Insular Gustativa (Ínsula Anterior) recibe del Área Insular Visceral (Ínsula Posterior) (McDonald y Jackson, 1987; Augustine, 1996; Wright y Groenewegen, 1996; McDonald, 1998; Shi y Cassell, 1998; Nakashima et al., 2000) esta región visceral podría actuar modulando el procesamiento de la información gustativa que se produce en la CI Anterior (Ogawa y Wang, 2002).

Estos resultados apoyarían el planteamiento propuesto por autores como Sowards y Sowards (Sowards y Sowards, 2001; 2002; Sowards, 2004) según el cual, el procesamiento de la información discriminativa sensorial y hedónica (en distintos sistemas cerebrales como el somatosensorial o el gustativo) se llevaría a cabo por vía neurales separadas y en paralelo. Así, según estos autores, dentro de la Corteza Insular los aspectos sensoriales de los estímulos serían procesados generalmente por las zonas más anteriores, mientras que la representación hedónica estaría localizada a un nivel más posterior. Esta posibilidad se ve apoyada por estudios conductuales y neuroanatómicos en los que se ha demostrado la existencia de convergencia de la información sensorial y visceral en esta zona cortical, e incluso en las mismas células de esta área (Hanamori et al., 1998; Ogawa y Wang, 2002). Es más, algunos estudios neurofisiológicos han comprobado convergencia de información gustativa de tipo apetitivo y aversivo en algunas células de la CI (Yamamoto et al., 1989), así como de información somatosensorial inocua y nociva en neuronas de esta misma región (Ogawa y Wang, 2002).

De acuerdo con todo ello, la estimulación de la Corteza Insular Posterior podría haber actuado activando alguno de los circuitos neurales implicados en el proceso de atribución de incentivo, provocando así la aparición de conductas de preferencias o aversión hacia los estímulos somatosensoriales y/ o gustativos con los que ha sido asociada. En este sentido, algunos investigadores consideran que la CI desempeña un papel fundamental en el proceso de aprendizaje acerca del valor recompensante de los alimentos (De Couteau et al., 1997; Balleine y Dickinson, 1998; 2000; Beninger y Miller, 1998; Ragozzino y Kesner, 1999). Por el contrario, lesiones de la CI Agranular provocan un deterioro del recuerdo (memoria de trabajo) de la magnitud del valor reforzante de la comida (De Couteau et al., 1997; Balleine y Dickinson, 1998; 2000; Ragozzino y Kesner, 1999), sin afectar a la localización espacial del refuerzo.

De momento, los datos disponibles en este estudio, no permiten determinar cual es la acción fisiológica concreta que ejerce la estimulación del Córtex Insular Posterior sobre

los distintos procesos biológicos para inducir preferencias y aversiones. Existe la posibilidad de que la estimulación haya podido actuar como sustituto adecuado del estímulo visceral durante el proceso de asociación establecido en el CPPc. En investigaciones previas llevadas a cabo en nuestro laboratorio, la estimulación eléctrica de diversas estructuras como el Área Postrema o la Corteza Insular, ha sido utilizada como un eficaz sustituto del estímulo visceral y/ o de sus consecuencias motivacionales, en paradigmas de aprendizaje discriminativo gustativo tanto aversivo (Gallo et al., 1988; Agüero et al., 1993b) como reforzante (Cubero y Puerto, 2000). Esta posibilidad sería compatible con los estudios conductuales, anatómicos y neurofisiológicos, que han sugerido que la Corteza Insular estaría implicada en el procesamiento de la información visceral (Cechetto y Saper, 1987; Yamamoto et al., 1989; Chikama et al., 1997; Hecht et al., 1999; King et al., 1999; De Lacalle y Saper, 2000; Zhang y Oppenheimer, 2000; Dupont et al., 2003; Gabbott et al., 2003; Vertes, 2004). De hecho se ha podido comprobar mediante técnicas neurofisiológicas que la activación cervical vagal (Ito, 1998) y la estimulación eléctrica del esófago (Hecht et al., 1999) provoca un aumento en la actividad de la CI. Por el contrario, la estimulación eléctrica de la CI induce cambios en la amplitud de las contracciones y del tono gástrico (Aleksandrov et al., 1996).

Siguiendo esta línea, nuestros datos podrían explicarse considerando que el efecto observado en este experimento, podría deberse a que la estimulación de la CI Posterior, podría haber activado un patrón neural específico que codifica la información visceral positiva (o negativa). De este modo la estimulación eléctrica de esta región cortical podría estar evocando patrones neurales relacionados con reforzadores viscerales naturales positivos, los cuales al ser asociados con un lugar en el espacio, originarían la preferencia por dicho contexto. Este efecto podría ser similar al observado cuando un estímulo gustativo se asocia a beneficios metabólicos, lo que elicitaba la preferencia gustativa por dicho estímulo (Puerto et al., 1976a; b; Puerto y Molina, 1977; Le Magnen, 1990).

Con respecto al grupo negativo descrito en este estudio, cabría la posibilidad de que la estimulación pueda activar células que codifican la información visceral negativa (por ejemplo relacionada con el dolor visceral), originando una sensación de malestar que hace que los animales eviten el lugar asociado a la estimulación. Diversos estudios conductuales, neurofisiológicos y anatómicos han relacionado a la Corteza Insular con procesos de aprendizaje aversivo gustativo así como con el procesamiento de la información somatosensorial y nociceptiva (Augustine, 1996; Bures et al., 1998; Cubero et al. 1999; Sakai y Yamamoto, 1999; Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000; Liotti et al., 2000; Peyron et

al., 2000; Shin et al., 2000; Treede et al., 2000; Zhang y Oppenheimer, 2000; Dupont et al., 2003...). En cualquier caso, no existe de momento suficiente evidencia para descartar ni confirmar esta hipótesis de trabajo que requiere una mayor investigación.

Finalmente, existe también la posibilidad de que los resultados obtenidos en este estudio, a saber, que las preferencias espaciales inducidas por la activación de la CI Posterior, puedan estar relacionadas con la activación de vías nerviosas de refuerzo intracerebral sobre las que también parecen actuar algunas drogas de abuso, opiáceos por ejemplo (Mansour et al., 1994; García et al., 1995; Burkey et al., 1996; Burkey et al., 1999; Paredes et al., 2000). Distintos autores han sugerido la posibilidad de que las diferentes modalidades de refuerzo (homeostático, estimulación eléctrica, sustancias de abuso, etc.) podrían compartir de algún modo un mismo sistema neurobiológico (Berman et al., 1994; Wolinsky et al., 1996; Fernández-Espejo, 2002; Kelley y Berridge, 2002). De hecho existen numerosos estudios que han examinado la interacción entre el estado nutritivo de los animales y algunas drogas de abuso como la morfina y la cocaína (Bechara y van der Kooy, 1992; Bell et al., 1997). Así, por ejemplo, el condicionamiento de preferencias por un lugar inducido por la comida, puede ser contrarrestado por los fármacos que habitualmente se utilizan (Nader y Van der Kooy, 1994) para el bloqueo de la acción de las drogas de abuso y otros procedimientos artificiales de recompensa (Agmo et al., 1995). Para comprobar esta hipótesis se llevó a cabo el siguiente experimento.



**CAPÍTULO IV: AVERSIONES Y PREFERENCIAS  
POR UN LUGAR INDUCIDAS MEDIANTE LA  
ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE LA CORTEZA  
INSULAR AGRANULAR POSTERIOR: EFECTO  
DE LA NALOXONA.**





## **EXPERIMENTO 5: Aversiones y preferencias por un lugar inducidas mediante la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular Posterior: Efecto de la Naloxona.**

---

Los resultados obtenidos en investigaciones previas en nuestro laboratorio y en el capítulo anterior de esta Tesis Doctoral, muestran que la estimulación eléctrica de la CI Agranular Posterior induce preferencias o aversiones hacia los estímulos con los que es asociada, ya sean de tipo gustativo (Cubero y Puerto, 2000) o espacial (Experimento 4 de esta Tesis Doctoral). Este hecho sugiere la participación de esta región cerebral en procesos reforzantes generales, no dependientes de las características sensoriales de los estímulos que se utilicen.

Existen numerosas pruebas de la existencia de una gran concentración de receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$  en la Corteza Insular (Mansour et al., 1994; García et al., 1995; Svingos et al., 1995; Burkey et al., 1996; Burkey et al., 1999; Izenwasser et al., 1999; Paredes et al., 2000; Vilpoux et al., 2002). Así diversos autores consideran que la Corteza Insular puede desempeñar un papel fundamental en la valoración hedónica de los estímulos gustativos (Yamamoto et al., 1989; Kiefer y Orr, 1992; Phillips et al., 1997; Yamamoto, 1998; Cubero y Puerto, 2000; Sowards, 2004). Dado que, la activación de esta región cerebral induce preferencias por los estímulos gustativos con los que es asociada (Cubero y Puerto, 2000), este efecto también podría estar mediado por la acción de opiáceos endógenos, ya que, como se ha mencionado con anterioridad, estas sustancias pueden modular las cualidades sensoriales de la comida haciéndola más apetecible, provocando la aparición del “ansia” o apetencia por consumirla (Le Magnen, 1990; Cooper y Higgs, 1994; Mercer y Holder, 1997).

Con respecto a la implicación de la CI en las propiedades motivaciones aversivas de la morfina, se ha demostrado que las lesiones del Córtex Visceral Insular Agranular, bloquean la adquisición del AAG inducido por morfina (Mackey et al., 1986). Este efecto

parece estar mediado también por la innervación dopaminérgica de la Corteza Insular, puesto que lesiones selectivas de las vías dopaminérgicas que recibe, elimina las aversiones gustativas condicionadas inducidas por la morfina, aunque no afecta al CPP que induce esta sustancia (Zito et al., 1988).

Por otra parte, Paredes y colaboradores (2000) han comprobado que después de la activación convulsivante (kindling/ nivel epiléptico) de la CI Granular, la instalación de los animales en una de las áreas del laberinto puede provocar el desarrollo de preferencias hacia esa zona. Estos autores demostraron además que este efecto puede estar mediado por la liberación de opiáceos endógenos, ya que la administración de naloxona (antagonista opiáceo) bloqueaba dicha preferencia.

Por último, distintos estudios conductuales han demostrado la implicación de la CI Agranular, en el procesamiento de las propiedades analgésicas de los opiáceos (Burkey et al., 1996; Burkey et al., 1999). Así, Burkey y colaboradores (1996, 1999) han demostrado que la administración de morfina en la Corteza Insular Agranular provoca un efecto analgésico que podría estar mediado por la acción de la morfina sobre los receptores opiáceos  $\mu$  localizados en la Corteza Insular Agranular rostral, ya que la administración (en dicha zona) de un antagonista como la naltrexona, bloquea este efecto analgésico.

Numerosas investigaciones han relacionado también a la CI con los efectos de distintas sustancias de abuso. Así por ejemplo, mediante técnicas inmuno-histoquímicas y de neuroimagen se ha comprobado que la administración de cocaína, heroína o marihuana provoca una activación de la CI (Mathew et al., 1997; Wang et al., 1999b; Porrino y Lyons, 2000; Sell et al., 2000; Bonson et al., 2002; O'Leary et al., 2002; Allen et al., 2003).

Todos estos resultados sugieren que las preferencias por un lugar inducidas por la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular Posterior podrían estar mediadas teóricamente, por el sistema de opiáceos endógenos. Para comprobar esta hipótesis se llevó a cabo el siguiente experimento en el que se ha utilizado un procedimiento concurrente de condicionamiento de preferencia por un lugar, de modo que tras dos sesiones adquisición y una vez establecidas las preferencias o aversiones hacia un lugar, se examinaría el efecto de la administración de un antagonista opiáceo (naloxona). Cabría esperar que si la activación reforzante inducida por la estimulación eléctrica intracerebral es debida a la acción de opiáceos endógenos, este efecto recompensante debería ser bloqueado por la acción antagonista de la naloxona.

## **MÉTODO.**

### **SUJETOS.**

Se emplearon 19 ratas macho Wistar suministradas por el Estabulario de la Universidad de Granada cuyos pesos oscilaron entre 280-360 g al inicio del estudio.

Hasta el inicio del protocolo experimental, estos animales se mantuvieron en el laboratorio en las condiciones descritas en el apartado de Método del Experimento 1.

### **INSTRUMENTOS.**

El instrumental empleado en este Experimento, fue el mismo que el descrito en el experimento anterior. Ahora se ha utilizado un antagonista opiáceo, Naloxona Clorhidrato (Laboratorios Sigma; St. Louis, U.S.A.), en dosis de 4 mg./ ml./ Kg.

### **PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.**

El procedimiento quirúrgico es idéntico al descrito anteriormente en el Capítulo III.

### **PROCEDIMIENTO CONDUCTUAL.**

***FASE 1: CONDICIONAMIENTO CONCURRENTES DE PREFERENCIA POR UN LUGAR (CPPc) EN EL LABERINTO CON FORMA DE CORREDOR (LABERINTO MODELO 1).***

*Fase de fijación de la intensidad de la corriente eléctrica apropiada.*

Esta fase se realizó de forma similar a la descrita en el experimento anterior, estableciendo así la intensidad de la estimulación adecuada para cada animal que, en este caso, osciló entre 70 y 385  $\mu$ A.

*CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIA.*

Los animales fueron examinados en una prueba de condicionamiento concurrente de preferencia por un lugar constituida por dos sesiones de adquisición (de 10 minutos cada una) llevadas a cabo en días sucesivos, de un modo similar al procedimiento utilizado en el laberinto Modelo 1 descrito en el Experimento 1.

De acuerdo con el comportamiento de los animales y los criterios de clasificación descritos en el Experimento 1 (Pág. 106) se formaron tres grupos según el tiempo de permanencia de los sujetos en cada una de las zonas del laberinto. La estimulación eléctrica de la CI Posterior inducía preferencias espaciales en 7 animales (“positivos”), aversión o evitación de la zona de estimulación en otros 7 animales (“negativos”) e indiferencia por cualquiera de las dos zonas en 5 animales (“neutros”). Estos animales “neutros” no reciben estimulación en ninguno de los procedimientos conductuales posteriores y pasaron a ser considerados como animales controles.

***FASE 2: NALOXONA Y CONDICIONAMIENTO CONCURRENTE DE PREFERENCIA POR UN LUGAR (CPPc) EN EL LABERINTO MODELO 1.***

Transcurridas 48 horas después de finalizar la fase anterior, a todos los animales se les inyectó el antagonista opiáceo, naloxona, vía subcutánea (4 mg./ ml./ Kg.). Tras 20 minutos desde la administración del fármaco, los animales fueron sometidos a una nueva sesión de condicionamiento concurrente de preferencia por un lugar en el laberinto con forma de corredor o Modelo 1, similar a la descrita anteriormente.

***FASE 3: NALOXONA Y CPPc EN LABERINTO EN T (MODELO 2).***

48 horas después de la administración del fármaco, todos los animales recibieron una nueva inyección de naloxona (4 mg./ ml./ Kg.) 20 minutos antes de ser sometidos a un nuevo proceso de condicionamiento por un lugar, aunque ahora en un laberinto diferente, Laberinto en T o Modelo 2 (descrito en el Experimento 1). En este nuevo test también se modificaron los índices espaciales externos (colocando el laberinto en posición Este/Oeste).

---

***FASE 4: CONDICIONAMIENTO CONCURRENTES DE PREFERENCIA POR UN LUGAR (CPPc) EN EL LABERINTO EN T (MODELO 2).***

Tras 48 horas, los animales volvieron a ser examinados en la prueba de condicionamiento espacial en el laberinto en T o Modelo 2 (similar al descrito en el Experimento I), pero esta vez sin la administración de naloxona.

***FASE 5: INDUCCIÓN DE AUTOESTIMULACION ELÉCTRICA INTRACEREBRAL.***

Una vez finalizado el experimento de condicionamiento de preferencia por un lugar, estos animales fueron sometidos a un proceso de aprendizaje de autoestimulación eléctrica intracerebral, similar al descrito en el Experimento 1.

**HISTOLOGÍA.**

Tras las pruebas conductuales descritas, los animales recibieron una sobredosis de anestésico (0.25 mg. de Pentotal sódico) y se realizó una pequeña lesión electrolítica para marcar la zona donde había estado situado el electrodo. Posteriormente, fueron perfundidos intracardialmente, con suero salino y una solución de formol. Los cerebros fueron extraídos y conservados en paraformaldehído al 10% durante varios días para posteriormente ser seccionados en láminas coronales de 80 micras con un vibrotomo. La posición de los electrodos fue verificada utilizando una tinción con Violeta de Cresilo (ver Figura 49).



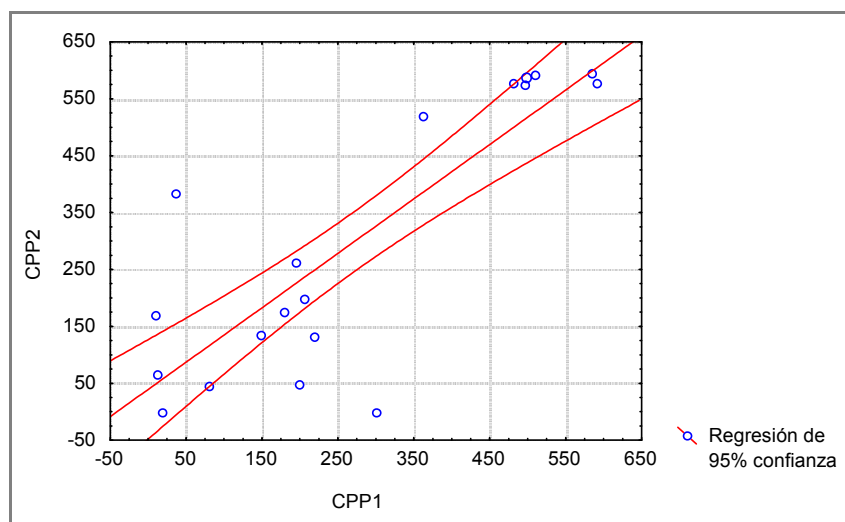
**Figura 49.** Fotografía que muestra una sección transversal del cerebro de un animal representativo del grupo “positivo”, donde se comprueba la localización del tracto del electrodo en la CI Agranular Posterior. Abreviaturas: ac: Comisura Anterior; AIP: Corteza Insular Agranular Posterior; CPu: Caudado Putamen; LV: Ventrículo Lateral.

## RESULTADOS.

### ***Fase 1: CPPc en el Laberinto con forma de corredor o Modelo 1.***

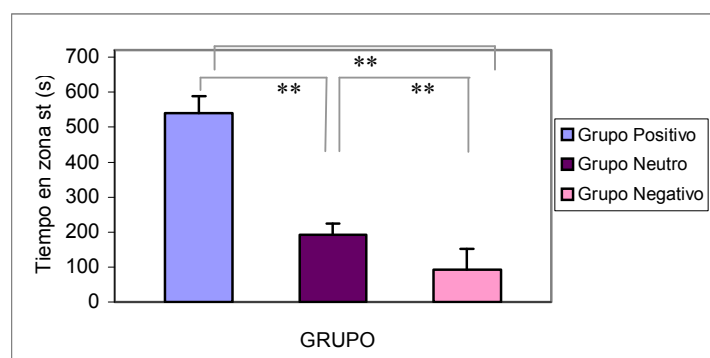
Para el análisis estadístico de las dos sesiones de adquisición del condicionamiento concurrente de preferencia por un lugar en el laberinto modelo 1, se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson, obteniendo una correlación significativa entre ambas ( $r = 0.827$ ;  $p < 0.01$ ) (ver Figura 50).

Siguiendo el criterio previamente establecido de distribución de los sujetos se puede comprobar que el grupo “positivo” formado por 7 animales permanecía en la zona estimulada una media de 539.35 s; el grupo “negativo”, también formado por 7 animales, presentaba una estancia media en la zona estimulada de 91.857 s, y por último, el grupo “neutro” constituido por 5 animales, mantenía una media de tiempo en la zona estimulada de 193.3 s.



**Figura 50.** Matriz de correlación entre el tiempo de permanencia de los animales en el compartimento estimulado, en cada una de las dos sesiones de condicionamiento concurrente de preferencia por un lugar en el laberinto Modelo 1.

Considerando el valor promedio del tiempo que los animales pasan en el compartimento estimulado en los dos ensayos de condicionamiento como índice de aprendizaje, se realizó un ANOVA unifactorial entre grupos. Como cabría esperar, los resultados (ver Figura 51) muestran que existen diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,16)} = 151.46$ ;  $p < 0.01$ ).

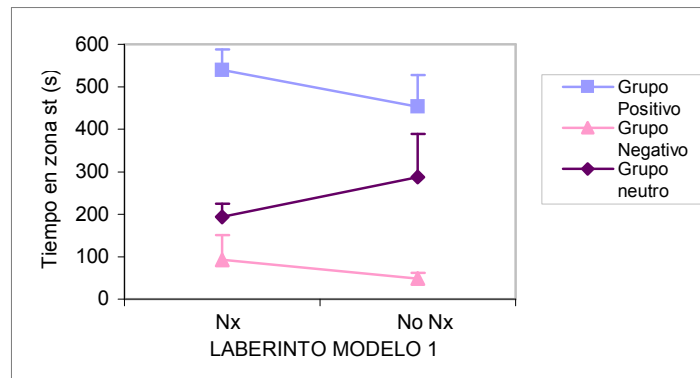


**Figura 51.** Representación gráfica del tiempo de permanencia medio (media de los dos días de condicionamiento expresado en segundos) mostrado por los animales de los distintos grupos en la zona del laberinto Modelo 1 asociada a la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular. Los asteriscos (\*\*) muestran las diferencias entre los grupos a un nivel de significación de 0.01.



### **Fase 2: CPPc: Efecto de la administración de naloxona en el Laberinto Modelo 1.**

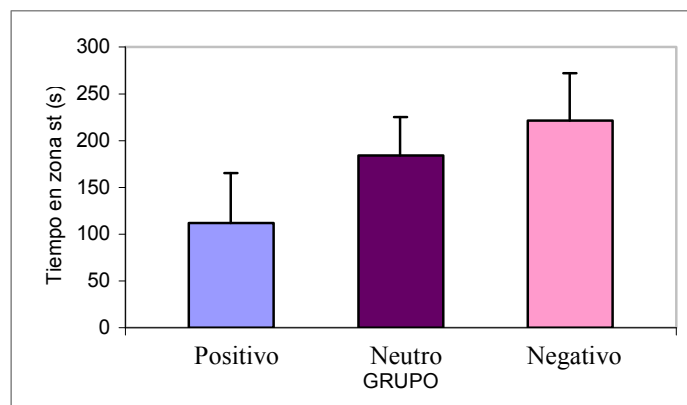
En esta fase se pretendía comprobar si los efectos obtenidos en la fase 1 de este estudio, podían estar mediados por el sistema de opiáceos endógenos y que por lo tanto podrían ser bloqueados mediante la administración de un antagonista opiáceo, la naloxona (Fase 2). Los resultados obtenidos en un ANOVA bifactorial mixto (Grupo x Sustancia) muestran que no hay efecto principal de la naloxona ( $F_{(1,16)} = 0.072$ ;  $p < 0.792$ ) ni tampoco de la interacción Grupo x Sustancia [ $F_{(2,16)} = 1.381$ ,  $p < 0.2796$ ] (ver Figura 52), pero si es significativo el efecto principal del factor grupo [ $F_{(2,16)} = 35.68$ ;  $p < 0.00001$ ]. Analizando el efecto principal del factor grupo, mediante comparaciones post hoc según el test de Newman-Keuls, se observaron diferencias significativas entre todos los grupos ( $p < 0.01$ ).



**Figura 52.** Representación gráfica del efecto de la administración de naloxona subcutánea sobre el condicionamiento de preferencia por un lugar inducido por la estimulación eléctrica intracerebral de la Corteza Insular en el laberinto Modelo 1, según el grupo.

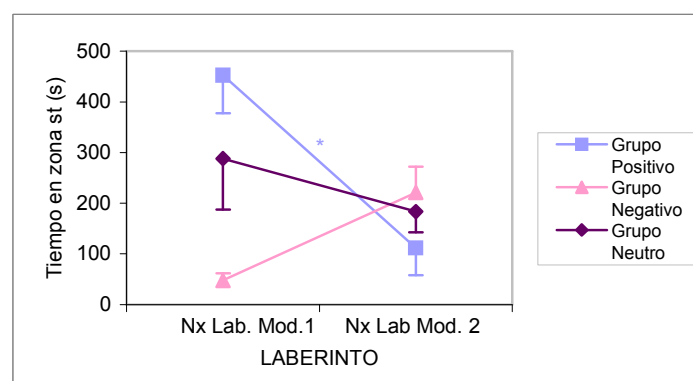
### **Fase 3: CPPc en el Laberinto en T o Modelo 2: Efecto de la administración de naloxona.**

Dado que los resultados anteriores podrían significar un efecto de retención del aprendizaje previo, se examinó esta posibilidad mediante una prueba en la que de nuevo, se administró naloxona pero ahora utilizando un laberinto diferente, laberinto en T o Modelo 2 (Fase 3). El análisis de los resultados de la primera sesión de condicionamiento en este laberinto modelo 2, mediante un ANOVA unifactorial entre grupos, permitió comprobar que la naloxona había eliminado las diferencias entre los grupos ( $F_{(2,16)} = 1.119$ ;  $p < 0.35$ ) (ver Figura 53).



**Figura 53.** Representación gráfica del tiempo de permanencia (expresado en segundos) mostrado por los animales, en la zona del Laberinto en T o Modelo 2 asociada a la estimulación eléctrica de la CI Agranular, tras la administración subcutánea de naloxona, según el grupo.

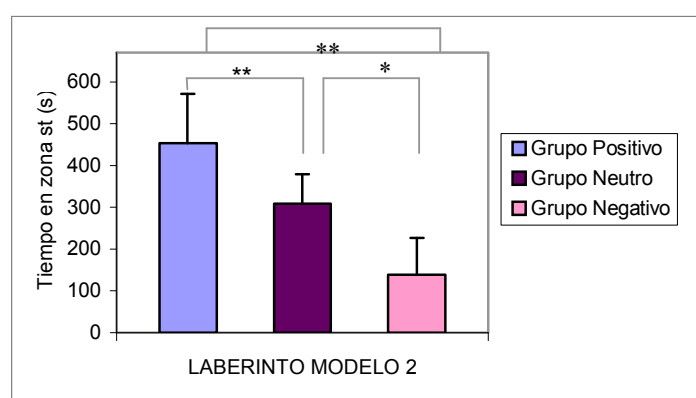
Una comparación de estos resultados con los obtenidos en el laberinto con forma de corredor (Modelo 1) muestra un efecto de la interacción Grupo x Laberinto ( $F_{(2,16)} = 7.667$ ;  $p < 0.0046$ ) (ver Figura 54). Aplicando un análisis post hoc Newman-Keuls se comprobó que existen diferencias en el grupo positivo en función del laberinto empleado ( $p = 0.025$ ), pero no en los demás grupos (grupo “negativo”,  $p = 0.282$ ; grupo “neutro”,  $p = 0.6204$ ). Asimismo existen diferencias entre el grupo “positivo” y el “neutro” en el laberinto Modelo 1 ( $p < 0.01$ ) pero no en el laberinto en T o Modelo 2 ( $p > 0.05$ ). Tampoco aparecen diferencias significativas entre los grupos en el Laberinto Modelo 2 ( $p > 0.05$ ).



**Figura 54.** Representación gráfica del efecto de la administración de naloxona subcutánea sobre el condicionamiento concurrente de preferencia por un lugar inducido por la activación de la Corteza Insular, según el laberinto (Laberinto Modelo 1 vs. Laberinto Modelo 2). El asterisco (\*) muestra las diferencias en el grupo “positivo” en función del laberinto empleado a un nivel de significación  $< 0.05$ .

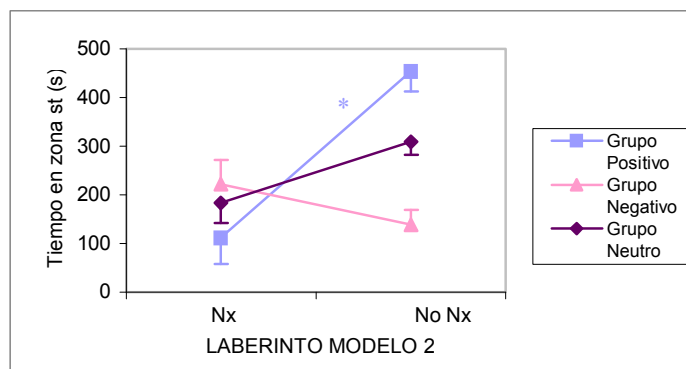
**Fase 4: CPPc en el Laberinto en T (Modelo 2).**

A continuación se examinó el efecto de la estimulación de la CI, utilizando de nuevo el laberinto en T, pero ahora sin la administración de naloxona. El análisis de los datos obtenidos mediante un ANOVA unifactorial EG muestra que, nuevamente la estimulación de la CI provoca diferencias entre los grupos ( $F_{(2,16)} = 18.683$ ;  $p < 0.0001$ ) (ver Figura 55).



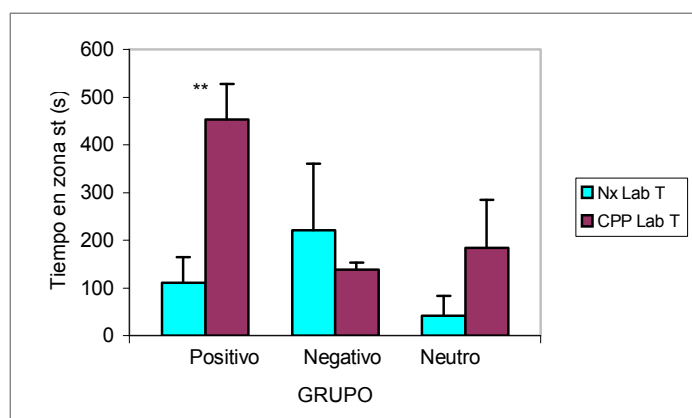
**Figura 55.** Representación gráfica del tiempo de permanencia (expresado en segundos) mostrado por los animales en la zona del laberinto en T o Modelo 2 asociada a la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular Posterior, según el grupo. Los asteriscos muestran las diferencias entre los grupos a un nivel de significación de 0.05 (\*) y 0.01(\*\*).

A continuación, se comparó el efecto de la naloxona vs. no/ naloxona sobre el condicionamiento espacial concurrente, en el laberinto en T o Modelo 2. Mediante un análisis bifactorial mixto de los datos obtenidos en este laberinto (naloxona vs. no/ naloxona), se comprobó que no hay efecto del factor grupo ( $F_{(2,16)} = 2.461$ ;  $p > 0.05$ ), pero si existe un efecto significativo de la naloxona ( $F_{(1,16)} = 11.463$ ;  $p < 0.01$ ) y de la interacción Grupo x Naloxona ( $F_{(2,16)} = 11.846$ );  $p < 0.01$ ). El análisis post hoc (test de Newman-Keuls) de la interacción nos muestra que sin naloxona, existen diferencias entre todos los grupos; en cambio tras la administración de este antagonista opiáceo el grupo “positivo” presenta diferencias significativas con respecto a la no administración de naloxona ( $p = 0.025$ ), pero esto no sucede en el resto de los grupos ( $p > 0.05$ ) (ver Figura 56).



**Figura 56.** Representación gráfica del efecto de la administración de naloxona sobre el tiempo de permanencia (expresado en segundos) de los animales en la zona del laberinto en T o Modelo 2 donde reciben estimulación de la CI, según el grupo. El asterisco (\*) muestra las diferencias en el grupo “positivo” en función de la administración de naloxona, a un nivel de significación de 0.05.

Cabe mencionar que, aunque la administración de naloxona no produce diferencias significativas en el grupo “negativo” con respecto a la no administración del fármaco ( $p > 0.08$ ), existe una tendencia de estos animales, a pasar más tiempo en la zona del laberinto donde reciben la estimulación de la CI cuando están bajo el efecto de la naloxona (ver gráfica 57). Es decir, “se hacen menos negativos”, desapareciendo en este caso las diferencias entre este grupo y el grupo “neutro”, llegando a ser los animales del grupo “negativo” los que más tiempo pasan en la zona donde reciben la estimulación.



**Figura 57.** Representación gráfica del efecto de la administración de naloxona (naloxona: Nx Lab T; no naloxona: CPP Lab T) sobre el tiempo de permanencia (expresado en segundos) de los animales en la zona del laberinto en T o Modelo 2 asociada a la estimulación eléctrica de la CI, según los distintos grupos (\*\*: nivel de significación  $< 0.01$ ).

***FASE 5: AUTOESTIMULACIÓN ELÉCTRICA INTRACEREBRAL.***

Por último y con respecto al proceso de inducción de autoestimulación eléctrica intracerebral en los animales de la CI, de nuevo se observó que estos animales no lograban aprender esta tarea, a pesar de los intentos de moldeamiento que se llevaron a cabo, es decir, de nuevo se reprodujo lo ocurrido con los animales del Experimento 4.

**DISCUSIÓN.**

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la inducción de preferencias y aversiones hacia el lugar en el que se produce la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular Posterior en un modelo de aprendizaje concurrente de preferencia por un lugar (CPPc) es un efecto consistente, que se repite a lo largo de las distintas sesiones de condicionamiento y que es independiente del contexto (recuperación del efecto de la estimulación en el laberinto en T).

La administración del antagonista opiáceo, naloxona, en el mismo laberinto en el que se produjo el aprendizaje no bloquea el efecto de la estimulación eléctrica (efecto similar al obtenido en el Capítulo I de esta Tesis Doctoral), resultado que puede ser interpretado como una consecuencia de la retención del aprendizaje. Resultados análogos se han obtenido mediante la administración de algunas sustancias de abuso como la heroína o la cocaína (McFarland y Ettenberg, 1998; Mueller y Steward, 2000). Sin embargo, como muestran los resultados obtenidos en la tercera fase de este estudio, si la naloxona se administra antes de que se haya establecido la asociación entre el refuerzo y un nuevo contexto, el condicionamiento de preferencia por un lugar, no se produce. Este resultado no puede ser atribuido a un efecto colateral de la naloxona sobre el sistema motor, que dificultaría la movilidad de los animales, ya que su administración no produce ningún efecto detectable en los animales pertenecientes al grupo “neutro” o “negativo”.

El bloqueo del refuerzo tampoco se debería a una extinción del efecto de la estimulación bien por alteraciones del electrodo o por lesiones en el tejido cerebral, por ejemplo, puesto que en ausencia de la naloxona los animales del grupo “positivo” reproducen las preferencias por un lugar asociadas a la activación eléctrica de la CI en el segundo de los laberintos utilizados.

Este resultado podría ser debido a que la naloxona ha podido actuar bloqueando la capacidad reforzante de la estimulación, algo esencial para establecer el aprendizaje. Mas aún, existe la posibilidad de que la administración de una dosis baja de naloxona que no induce efectos conductuales aversivos, en animales que previamente han recibido estimulación reforzante, provoque un efecto aversivo (ver Figura 53) similar al inducido por el síndrome de abstinencia agudo a los opiáceos precipitado por la administración de naloxona (Blokhina et al., 2000).

Por último se repite la ausencia de conductas de autoestimulación, un resultado similar al observado en otros estudios (Cubero y Puerto, 2000) así como en el experimento anterior de esta Tesis Doctoral. Este hecho parece sugerir que la CI posterior no parece formar parte de los circuitos generales de refuerzo intracerebral que sustentan conductas de autoestimulación, aunque podría formar parte de otros sistemas de refuerzo no determinados.

En efecto, el refuerzo inducido por la estimulación eléctrica de la CI Agranular Posterior puede ser debido a la activación de vías de refuerzo/aversión, mediadas por los sistemas opiáceos, en una región con una alta densidad de receptores  $\kappa$ ,  $\delta$  y  $\mu$  (Mansour et al., 1994; García et al., 1995; Svingos et al., 1995; Burkey et al., 1996; Burkey et al., 1999; Izenwasser et al., 1999; Allen et al., 2003; Leppä et al., 2006). En este sentido, distintas investigaciones han relacionado a la CI con los diferentes efectos de los opiáceos (Mackey et al., 1986; Zito et al., 1988; Burkey et al., 1996; Burkey et al., 1999) y Burkey y colaboradores (1996), interviniendo sobre zonas de la Corteza Insular sensibles a los opiáceos, han demostrado un importante efecto analgésico de la morfina a través de esta región.

Asimismo, distintos estudios farmacológicos, en combinación con técnicas de neuroimagen (resonancia magnética funcional y tomografía por emisión de positrones), han demostrado la activación de la Corteza Insular en respuesta a estímulos térmicos dolorosos, un efecto que se reduce tras la administración del analgésico remifentanilo o fentanilo, un agonista de los receptores  $\mu$  opiáceos de ultra-corta duración (Casey et al., 2000; Wise et al., 2002).

Por otra parte, la CI ha sido relacionada con el procesamiento de las propiedades aversivas de la morfina (Mackey et al., 1986; Zito et al., 1988). Lesiones de esta región cortical bloquean el AAG inducido por la morfina, sin afectar a las aversiones gustativas

condicionadas inducidas por otras sustancias aversivas como el cloruro de litio (Mackey et al., 1986). Estos datos sugieren que la Corteza Insular Agranular también podría formar parte de un circuito neural implicado en el procesamiento de la información motivacional aversiva de los opiáceos cuando es transmitida por vía vagal (Mackey et al., 1986; Zito et al., 1988; Bechara et al., 1993).

En este sentido, se han detectado receptores opiáceos  $\kappa$  en la CI (Burkey et al., 1996; Izenwasser et al., 1999), y se ha comprobado que la administración de agonistas de esta modalidad, produce aversión hacia un lugar (Herz y Spanagel, 1995; Shippenberg y Elmer, 1998). Por tanto cabe la posibilidad de que los resultados de aversión/ evitación obtenidos en el grupo “negativo” sean debidos a la activación de los opiáceos relacionados con este tipo de receptores. Como se puede comprobar en la Figura 54, aunque el efecto de la naloxona no es significativo (quizá por el reducido número de animales implicados) (Skoubis et al., 2001), existe una tendencia en el grupo “negativo” a pasar un tiempo mayor en la zona donde reciben la estimulación cuando están bajo el efecto de la naloxona. De hecho cuando se administra naloxona en un nuevo contexto (Laberinto en T), el grupo “negativo” es el que más tiempo permanece en el lugar asociado a la activación de la CI. Este resultado sugiere que la naloxona, un antagonista opiáceo no selectivo que produce un potente bloqueo del receptor  $\mu$  y un antagonismo moderado sobre los receptores  $\kappa$  y  $\delta$  (Pinazo, 1997), podría estar provocando un bloqueo parcial del efecto aversivo, lo cual apoyaría así la hipótesis de que el efecto aversivo generado por la estimulación eléctrica de la Corteza podría estar mediado por opiáceos que actúan sobre receptores  $\kappa$ .

Pero, los opiáceos endógenos están implicados sobre todo, en los mecanismos de recompensa o refuerzo (Herz y Spanagel, 1995; van Ree et al., 1999; van Ree et al., 2000; Bodnar y Hadjimarkou, 2003; Gerrits et al. 2003). Al igual que los opiáceos exógenos, estas sustancias ejercen una acción reforzante capaz de inducir preferencias por un lugar (CPP) (Paredes et al., 2000) y de ser auto-administrados por animales de laboratorio (Gerrits et al., 2003). En este sentido, se han observado resultados compatibles con los obtenidos en el grupo “positivo”, por ejemplo, en estudios llevados a cabo después de la activación convulsivante de la Corteza Insular Granular (Paredes et al., 2000) o tras la administración de morfina (McDonald et al., 1997; Blokhina et al., 2000; Parker et al., 2002; Kawasaki et al., 2005).

Más aún, estudios llevados a cabo con técnicas de neuroimagen han permitido comprobar una activación de la Corteza Insular cuando sujetos adictos a la cocaína o la

heroína mantenían una conversación relacionada con el consumo de la droga o cuando informaban de la necesidad o urgencia por consumir estas sustancias (“craving”) (Wang et al., 1999; Sell et al., 2000; Bonson et al., 2002; Kilts et al., 2004).

Finalmente, en estudios llevados a cabo con animales, se ha comprobado que la simple presencia de índices contextuales que previamente habían sido asociados con sustancias de abuso como la morfina o la nicotina, provoca la activación de áreas corticales, como el Córtex Prefrontal, la Corteza Insular Agranular, o límbicas, normalmente implicadas en el establecimiento del aprendizaje asociativo con reforzadores naturales y en la toma de decisiones (Schroeder et al., 2000; Schroeder et al., 2001; Schroeder y Kelly, 2002).

Por otra parte, existe evidencia a favor de la implicación de esta región cerebral en el proceso de atribución de incentivo, y en la valoración hedónica innata o aprendida de los estímulos gustativos (Yamamoto et al., 1989; Kiefer y Orr, 1992; Phillips et al., 1997; Cubero y Puerto, 2000). Así, se ha demostrado que las lesiones de la CI Agranular provocan un deterioro en la memoria de la magnitud del valor reforzante de la comida lo cual hace que los animales no sean capaces de adaptar su conducta ante una devaluación de la recompensa (DeCouteau et al., 1997; Balleine y Dickinson, 1998, 2000; Ragozzino y Kesner, 1999).

Para algunos autores la adquisición de esta modalidad de aprendizaje no constituye solo la representación de un proceso asociativo o de correlación entre dos eventos, según el cual el animal ante un estímulo espera la aparición de un evento reforzante, con el cual ha sido previamente asociado, sino que significaría un proceso mucho más complejo. Concretamente el aprendizaje de incentivo implicaría la adquisición de una representación cognitiva de la recompensa o del estímulo reforzante y su relación con las distintas alternativas de respuesta, así como un conocimiento explícito de la relación entre la conducta y sus consecuencias, permitiendo así al sujeto, hacer inferencias sobre eventos que aún no han ocurrido (Balleine y Dickinson, 1998).

En este sentido, a través de las técnicas de neuroimagen se ha podido poner de manifiesto la activación de la CI ante la anticipación o la expectativa de un futuro refuerzo o castigo (Schoenbaum et al., 1998; Kirsch et al., 2003), así como ante cambios en la magnitud del refuerzo o del castigo esperado (Elliot et al., 2000; Gottfried et al., 2003; O’Doherty et al., 2003; Ullsperger y von Cramon, 2003) empleando para ello distintos tipos



de refuerzo (verbal, monetario, ...) así como estímulos de distintas modalidades sensoriales (estímulos visuales, olfatorios, gustativos) .

Estos resultados proponen en fin, que la Corteza Insular podría estar implicada en procesos de atribución de incentivo y por tanto, siguiendo este último planteamiento, en procesos de aprendizaje flexible. Para examinar las características de los procesos de aprendizaje en los que puede estar implicada la Corteza Insular Agranular se realizó el siguiente experimento.

**CAPÍTULO V: PERSISTENCIA REFORZANTE  
Y EFECTOS MOTORES DE LA ESTIMULACIÓN  
ELÉCTRICA REPETIDA DE LA CORTEZA  
INSULAR AGRANULAR POSTERIOR Y DE LA  
ADMINISTRACIÓN DE NALOXONA EN TAREAS  
DISCRIMINATIVAS NO DEMORADAS.**



---

## **EXPERIMENTO 6: Persistencia reforzante y efectos motores de la estimulación eléctrica repetida de la Corteza Insular Agranular Posterior y de la administración de naloxona en tareas discriminativas no demoradas.**

---

La Corteza Insular (CI) constituye una región cerebral que ha sido relacionada con muy diversas funciones, entre ellas con el procesamiento gustativo-nutritivo y visceral (Yamamoto et al., 1980; Cechetto y Saper, 1987, Yamamoto et al., 1989; Ito, 1992; 1994; 1998; Zhang y Oppenheimer, 1997; Hecht et al., 1999; King et al., 1999; Sakai y Yamamoto, 1999; Swards y Swards, 2001; Ogawa y Wang, 2002; Swards, 2004...). La convergencia de información visceral y sensorial existente (información gustativa, olfatoria, somatosensorial, nociceptiva, barorreceptiva y quimiorreceptiva), así como las conexiones anatómicas que posee con el sistema límbico (ver apartado de Conexiones anatómicas de la Corteza Insular en la Introducción Teórica de esta Tesis Doctoral, Pág. 79), permiten pensar que esta región podría desempeñar funciones integradoras (Augustine, 1996; Swards, 2004) así como por ejemplo, en la valoración hedónica o en el procesamiento de la información emocional (Yamamoto et al., 1989; Zhang y Oppenheimer, 2000; Shin et al., 2000).

Con respecto a la valoración hedónica, innata o aprendida, de los estímulos gustativos hay autores que consideran a esta estructura como esencial (Kiefer y Orr, 1992; Phillips et al., 1997; Ragozzino y Kesner, 1999). Así, Yamamoto y colaboradores por ejemplo, han identificado dos tipos de células en la Corteza Insular: Las células gustativas “primarias” y las células gustativas “secundarias” (Yamamoto et al., 1980; Yamamoto et al., 1988; Yamamoto et al., 1989). Las células gustativas primarias, concentradas fundamentalmente en las regiones Granular y Disgranular de la CI Anterior, procesan la cualidad sensorial básica del estímulo gustativo (dulce, salado, amargo y ácido) (Scott et al., 1984; Yamamoto et al., 1984; Yamamoto et al. 1985 b,c; Yamamoto et al., 1988; Yamamoto et al., 1989; Hayama y Ogawa, 2001). Mientras que las células gustativas

“secundarias” o hedónicas, que se localizan en la periferia de la Corteza Insular Granular Anterior, limitando con el Área Posterior Insular, se caracterizan por responder a los aspectos hedónicos o de valoración innata/ adquirida de la significación biológica de los estímulos (Yamamoto et al., 1985 b, c; Yamamoto et al., 1989). Yamamoto y su grupo ha descrito también en esta zona, células que se caracterizan por un patrón de respuesta que puede modificarse tras la adquisición de aversiones gustativas en sujetos entrenados en un paradigma de aprendizaje aversivo gustativo (AAG). Es decir, células que presentan una respuesta que podemos denominar “de preferencia innata por un determinado sabor” (sacarina), y tras la adquisición de la aversión, cambian su patrón, mostrando una respuesta propia de rechazo (reacción ante la quinina) (Yamamoto et al., 1989). Un efecto similar se ha observado en otras áreas gustativas localizadas a niveles inferiores del Tronco-encéfalo, concretamente en el NTS y el Complejo Parabraquial, aunque también en áreas hipotalámicas (Schwartzbaun, 1983; Di Lorenzo y Hecht, 1993). Estos resultados pueden explicar por qué lesiones de la Corteza Insular bloquean el AAG, impidiendo el cambio en la valoración hedónica (de positiva a aversiva) que habitualmente ocurre en este tipo de aprendizaje (Kiefer y Orr, 1992).

Por otra parte, la CI Agranular también parece desempeñar un papel fundamental en el procesamiento de la información relacionada con el valor incentivo de los alimentos (DeCouteau et al., 1997; Balleine y Dickinson, 1998; 2000; Ragozzino y Kesner, 1999). Diversos estudios conductuales que implican una devaluación del valor reforzante de la comida, muestran que las lesiones de la CI Agranular dificultan la capacidad de los animales para retener o recordar la información relacionada con el valor de la recompensa y así poder llevar a cabo las conductas compensatorias apropiadas (DeCouteau et al., 1997; Ragozzino y Kesner, 1999).

Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado que la estimulación eléctrica de la Corteza Insular induce preferencias por los estímulos gustativos con los que fue asociada, en tareas de aprendizaje demoradas (Cubero y Puerto, 2000). Una vez más, los datos obtenidos en este estudio, pueden interpretarse en el sentido de que el efecto fisiológico de la estimulación puede implicar una actuación sobre neuronas gustativas que procesan la valoración hedónica de los estímulos gustativos, potenciándola, o por el contrario puede deberse a un efecto reforzante del procesamiento de la información visceral que se producen esta zona. Concretamente y dado que la estimulación puede actuar como un buen sustituto del estímulo visceral (Gallo et al., 1988; Agüero et al., 1993), la activación de la Corteza Insular Posterior ha podido sustituir las consecuencias viscerales

(positivas o negativas) de un estímulo natural. Así, el efecto conseguido sería similar al observado cuando se establece la asociación de un estímulo gustativo con los beneficios metabólicos originados tras la ingesta de un producto nutritivo (Puerto et al., 1976a, b; Puerto y Molina, 1977; Le Magnen, 1990).

En este sentido, estudios llevados a cabo por Aleksandrov y sus grupo (1996) demuestran que la activación eléctrica de un grupo neuronal de las capas Disgranular y Agranular de la Corteza Insular, provoca cambios en la amplitud de las contracciones y del tono gástrico. Y al revés, diversos estudios han relacionado a la CI con el procesamiento de la información visceral vagal (Ito, 1998; Zhang y Oppenheimer, 2000).

Asimismo, las lesiones de la Corteza Insular Visceral Agranular o la eliminación de la inervación dopaminérgica de esta región mediante 6-OHDA, bloquea la adquisición del AAG inducido por la administración periférica de morfina (Mackey et al., 1986; Zito et al., 1988). Estos resultados sugieren que la CI Agranular podría constituir uno de los componentes del circuito neural vagal implicado en el procesamiento de las propiedades aversivas de los opiáceos (Mackey et al., 1986; Zito et al., 1988; Bechara et al., 1993).

Muy recientemente se ha demostrado que el sistema interoceptivo, y dentro de éste, la Corteza Insular, podría ser clave en el procesamiento de la información visceral inducida por la administración de productos que provocan malestar gastrointestinal (como el cloruro de litio), y de las señales o sensaciones interoceptivas derivadas del consumo repetido de algunas sustancias de abuso como las anfetaminas o la nicotina (Contreras et al., 2007; Naqvi et al., 2007). Otras investigaciones también han demostrado la implicación de la Corteza Insular en los efectos inducidos por distintas sustancias de abuso como la morfina, la heroína, la marihuana o la cocaína (Burkey et al., 1996; Mathew et al., 1997; Paredes et al., 2000; Wang et al., 1999b; Porrino y Lyons, 2000; Bonson et al., 2002; O'Leary et al., 2002; Allen et al., 2003). La administración repetida de éstas y otras sustancias de abuso, como la morfina, puede originar un efecto de tolerancia o sensibilización hacia algunos de los efectos que provocan, y un estado de dependencia que se manifiesta por la aparición de síntomas característicos del síndrome además de la presencia de una necesidad imperiosa o ansias (cravings) por consumir dichas sustancias (Bakshi y Kelley, 1994; Herz y Spanagel, 1995; Bell et al., 1997; Hamamura et al., 1997; Van Ree et al., 1999; Bernstein y Welch, 1998; Mao, 1999; Mitchell et al., 2000; Drouin et al., 2002; Everitt et al., 2001; Narita et al., 2001; Taylor y Fleming, 2001; De Vries y Shippenberg, 2002; Maldonado, 2002; Avena y Hoebel, 2003; Bodnar y Hadjimarkou, 2003; Gerrits et al., 2003; Sun y Dalman,

2003; Viganò et al., 2003; Koob y Le Moal, 2006). Estos síntomas pueden aparecer como consecuencia de una interrupción brusca en el consumo de las drogas o también, por la administración de fármacos antagonistas específicos, como por ejemplo, en el caso de los opiáceos, la naloxona (van Ree et al., 1999; Narita et al., 2001; Parker et al., 2002; Gerrits et al., 2003). En animales, se incluyen algunos signos somáticos tales como temblores, rechinar de los dientes, pérdida de peso o diarrea, y a nivel conductual, se observan cambios en la conducta exploratoria como un aumento en la actividad locomotora vertical (respuestas de alzada/ “rearings”), una tendencia a las conductas de escape, posturas anormales o sacudidas del lomo, entre otras (Koob et al., 1993; Kreek y Koob, 1998; Liu et al., 1999; Tzechentke y Schmidt, 1999; Berke y Hyman, 2000; Stinus et al., 2000; Hamlin et al., 2001; Narita et al., 2001; Zhou et al., 2003).

Estas investigaciones junto con los datos obtenidos en el capítulo anterior de esta Tesis Doctoral, sugieren que el efecto reforzante inducido mediante la estimulación eléctrica de la CI podría deberse a la activación de las vías neurales de refuerzo cerebral sobre las que pueden actuar también otros reforzadores como algunas drogas de abuso. En este sentido, se ha analizado si el efecto de la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular posee características similares a las observadas tras la administración de estas sustancias de abuso. Concretamente el objetivo de esta serie experimental ha consistido en examinar algunas de las características del refuerzo inducido por la estimulación eléctrica de la CI Agranular Posterior utilizando tareas de aprendizaje discriminativo y en particular en contigüidad. Se ha puesto a prueba su flexibilidad, la consistencia del efecto reforzante de la estimulación tras incrementar el número de ensayos y las consecuencias comportamentales de la estimulación repetida, todo ello a través del registro de dos índices de la respuesta motora (número de cruces y número de respuestas de alzada/ “rearings”), o tras la administración de un antagonista opiáceo, la naloxona.

## **MÉTODO.**

### **SUJETOS.**

Para este experimento se utilizaron 35 ratas albinas, raza Wistar, suministradas por el Animalario de la Universidad de Granada, cuyo peso al inicio del experimento osciló entre 270 y 330 g.

A su llegada al laboratorio, fueron aleatoriamente distribuidas en dos grupos, uno implantado con electrodos intracerebrales (formado por 24 animales) y un grupo control con falso implante (11 ratas).

Hasta el momento de inicio del protocolo experimental, los animales fueron mantenidos en el laboratorio en las condiciones generales descritas en el apartado de Método del Capítulo I.

## **PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.**

El procedimiento quirúrgico fue idéntico al descrito en los experimentos anteriores, aunque en este caso además se utilizó un grupo control con falso implante (procedimiento quirúrgico descrito en el Experimento 3 del Capítulo II de esta Tesis). Como se mencionaba en el Capítulo II, estos animales no poseen electrodo intracerebral, disponiendo sólo del electrodo “masa” que queda implantado en la superficie del cráneo.

A continuación los animales pasaron a un periodo de recuperación, de al menos 10 días, durante el cual dispusieron de comida y agua ad libitum.

## **INSTRUMENTOS.**

Las jaulas empleadas para los animales así como los materiales utilizados para el procedimiento quirúrgico fueron los mismos que los empleados en los experimentos anteriores (ver apartado de Instrumentos del Capítulo I de esta Tesis Doctoral).

El equipo empleado para administrar y monitorizar la corriente eléctrica, así como el necesario para llevar a cabo la histología, fue el mismo que el descrito en los experimentos anteriores.

Para el condicionamiento espacial se emplearon dos laberintos diferentes:

*Modelo 3:* Laberinto rectangular de metacrilato, con unas dimensiones de 50 x 25 x 30 cm., en el que se podían diferenciar tres áreas: una zona central con una superficie de 8 x 25 cm., cuyo suelo y paredes eran de metacrilato blanco; y dos



compartimentos laterales con una dimensión de 20 x 25 cm cada uno, de metacrilato negro con rayas blancas de un grosor aproximado de 2 cm. Estas dos regiones laterales diferían en cuanto a la disposición de las rayas, que en una zona estaban dispuestas en sentido vertical y en la otra en sentido horizontal, y en lo referente al suelo, que en uno de los laterales consistía en una lámina corcho marrón con unas incisiones horizontales de 8 x 1 cm.; mientras que el otro lateral incluía incisiones circulares cuyo diámetro fue de 1.5 cm. aproximadamente (ver Figura 58).



**Figura 58.** Vista desde arriba del Laberinto Modelo 3 utilizado para el establecimiento del condicionamiento de preferencia por un lugar.

*Modelo 1:* El segundo laberinto empleado fue el laberinto con forma de corredor o Modelo 1 descrito en los experimentos anteriores (ver detalles en el Experimento 1 de esta Tesis Doctoral y Figura 23).

Los estímulos gustativos empleados fueron preparados en una concentración de 0.5 cc. de extracto con sabor a "Fresa" o a "Coco" según el caso, por cada 100 ml. de agua (McCormick, Co. Inc. San Francisco, California).

Al igual que en los experimentos 1 y 5 de esta Tesis Doctoral, el antagonista opiáceo que se utilizó en la Fase Experimental 4, fue Naloxona Clorhidrato (Laboratorios Sigma), con una dosis de 4 mg./ Kg. diluida a 1ml./ Kg. en agua destilada.

## **PROCEDIMIENTO CONDUCTUAL.**

Antes de iniciar el procedimiento conductual, uno de los animales perteneciente al grupo "control con falso implante" tuvo que ser excluido del estudio porque mostraba conductas de giro.

---

***FASE 1: MODALIDAD CONCURRENTE DEL CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIA POR UN LUGAR.***

*Fase de fijación de la intensidad de la corriente eléctrica apropiada.*

La fase de exploración de la intensidad previa al procedimiento conductual, se realizó de igual forma a la descrita en el Experimento 3. En este caso los niveles de intensidad utilizados para el procedimiento conductual oscilaron entre 60 y 150  $\mu\text{A}$ .

***CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIA.***

Todos los animales fueron sometidos a una prueba de condicionamiento de preferencia por un lugar, en el caso de los animales con falso implante la colocación de los conectores no iba acompañada de estimulación eléctrica, aunque en cualquier caso se registraba el tiempo de permanencia en cada zona del laberinto.

Este proceso de aprendizaje se llevó a cabo de forma similar a la descrita en los experimentos anteriores, empleando dos laberintos distintos (descritos en el apartado de Instrumentos) para asegurar la correcta asignación de los animales a los distintos grupos. Se realizaron tres sesiones de CPP consecutivas, las dos primeras se llevaron a cabo en el primer laberinto (Modelo 3), mientras que la tercera (para confirmar los resultados obtenidos) tuvo lugar en el segundo laberinto (Modelo 1).

Para la distribución de los animales entre los distintos grupos se aplicó el mismo criterio establecido en el Experimento 1, teniendo en cuenta para ello la ejecución de los animales en el segundo día de condicionamiento en el primer laberinto y los resultados obtenidos en el segundo laberinto. De acuerdo con estos datos, los animales se distribuyeron en dos grupos, un grupo “positivo” formado por 9 sujetos y un grupo “neutro” constituido por 15 animales. De los 15 animales neutrales se seleccionaron 5 al azar, que junto con otros 5 sujetos del grupo “control con falso implante”, constituyeron el grupo “control” empleado en las siguientes fases experimentales. A partir de este momento los animales que pertenecían al grupo “control” no vuelven a recibir estimulación en ninguno de los procedimientos experimentales posteriores.

***FASE 2: APRENDIZAJE DE PREFERENCIAS DE UNA TAREA DE DISCRIMINACIÓN GUSTATIVA.***

La fase de preentrenamiento y la fase de aprendizaje de preferencias gustativas se llevó a cabo siguiendo el procedimiento empleado en el Experimento 3 de esta Tesis Doctoral (ver Esquema 2).

|                              | SESIÓN 1   | SESIÓN 2  | SESIÓN 3   | SESIÓN 4   | TEST  |
|------------------------------|--|---|------------|------------|---|
| <b>Mitad de los animales</b> | FRESA (izda.)<br>(7 min.)<br><br>+<br><br>ESTIMULACIÓN<br>(10 minutos)   | COCO (dcha.)<br>(7 min.)<br><br>+<br>NO<br>ESTIMULACIÓN<br>(10 minutos) | = Sesión 1 | = Sesión 2 | FRESA (izda.)<br><br>COCO (dcha.)<br><br>7 min. |
| <b>Mitad de los animales</b> | FRESA (izda.)<br>(7 min.)<br><br>+<br>NO<br>ESTIMULACIÓN<br>(10 minutos) | COCO (dcha.)<br>(7 min.)<br><br>+<br>STIMULACIÓN<br>(10 minutos)        | = Sesión 1 | = Sesión 2 | FRESA (izda.)<br><br>COCO (dcha.)<br><br>7 min. |

**Esquema 2.** Diagrama que muestra el procedimiento conductual llevado a cabo en el Experimentos 6 en el cual la estimulación eléctrica (ST) de la CI Agranular Posterior es asociada a un estímulo gustativo, Fresa o Coco, balanceando tanto el estímulo asociado a la estimulación como la posición que ocupa (izquierda; derecha), en una tarea de discriminación gustativa en contigüidad inter-estimular.

Tras dos ensayos de adquisición los animales fueron sometidos a un Test de Discriminación Simultánea o Test de Elección (Test 1) y seis horas más tarde se realizó un Test de Inversión (descrito en el Experimento 3 A de esta Tesis, Pág. 137):

Sesión 1- Sesión 2- Sesión 3- Sesión 4- Test Discriminación Simultánea 1- Test Inversión

A continuación los animales fueron sometidos de nuevo a dos ensayos de aprendizaje iguales a los descritos previamente, finalizando otra vez con el Test de Discriminación Simultánea (Test 2):

Sesión 5- Sesión 6- Sesión 7- Sesión 8- Test Discriminación Simultánea 2.

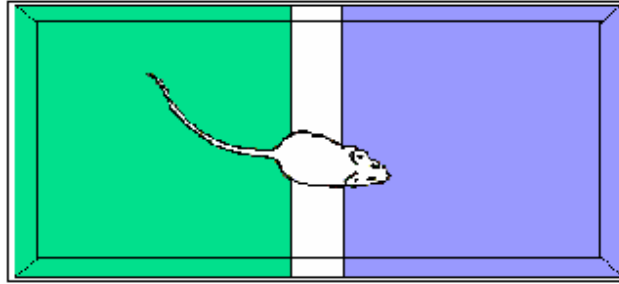
Al final de cada sesión el animal es desconectado del sistema de estimulación eléctrica y recibe una determinada cantidad diaria de alimento (14 g).

### ***FASE 3: REGISTRO DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN EL LABERINTO MODELO 1.***

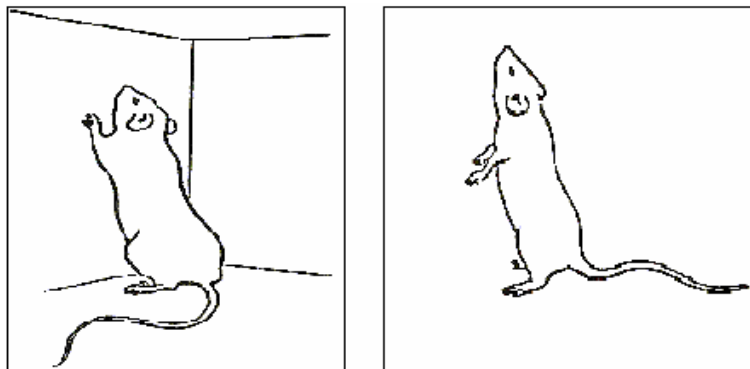
Esta fase comenzó 48 horas después del segundo Test de Discriminación Simultánea. El procedimiento empleado consistió en situar al animal en la zona central del corredor de preferencia para registrar a continuación distintos parámetros de su actividad locomotora, durante un periodo de 21 minutos. Los parámetros conductuales que se registraron fueron, el **número de cruces** que los animales realizaban al pasar de una a otra zona del corredor de preferencia (zonas laterales y zona central) y la **actividad vertical** o número de veces que el animal se levantaba sobre sus patas traseras (“rearing”/ respuestas de alzada) (ver Figura 59).

Una vez finalizada cada sesión los animales fueron devueltos a sus jaulas. Durante esta fase los animales continuaron disponiendo de 7 minutos diarios de agua y recibieron 14 g. de alimento al final de las sesiones experimentales.

**FASE 3: ÍNDICES DE ACTIVIDAD CONDUCTUAL**



**A. ACTIVIDAD HORIZONTAL: CRUCES**



**B. ACTIVIDAD VERTICAL: “REARINGS”/RESPUESTAS DE ALZADA**

**Figura 59.** Representación gráfica de los índices de actividad locomotora (A) Horizontal (número de cruces) y (B) Vertical (número de “rearings”/ respuestas de alzada), mostrada por los animales en el laberinto Modelo 1 (Fase 3) (Adaptado de Pinazo, 1997).

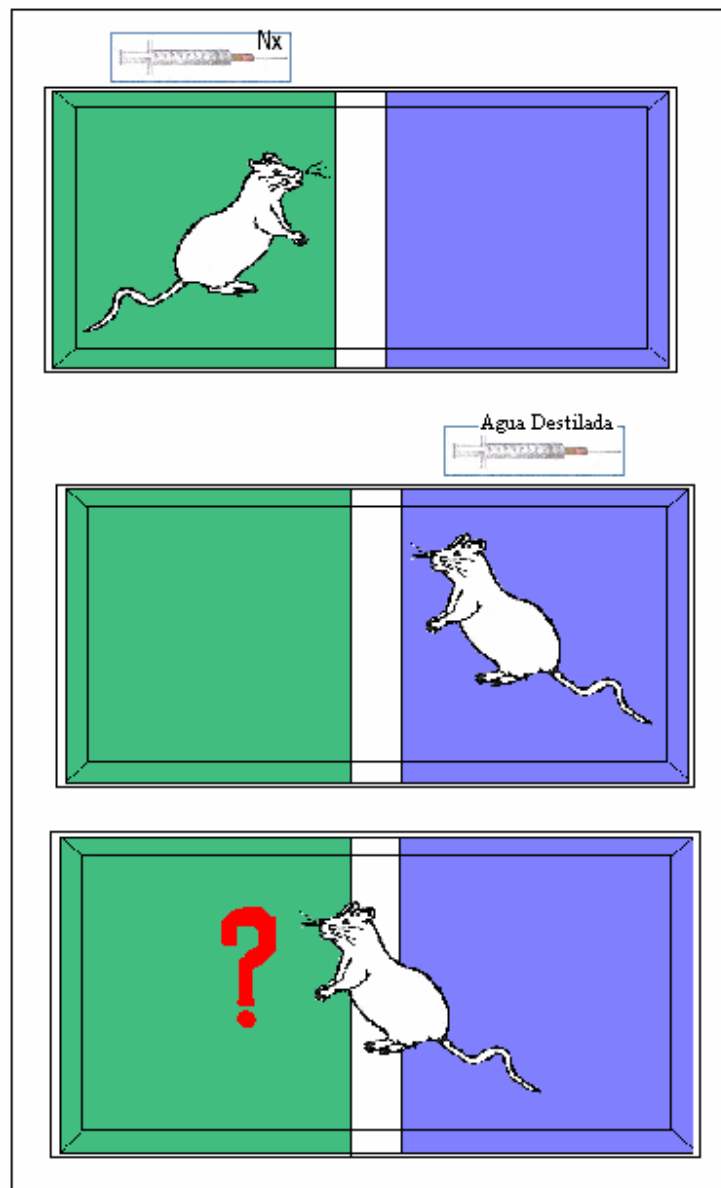
**FASE 4: NALOXONA Y EVITACIÓN/ PREFERENCIAS POR UN LUGAR EN UNA TAREA DE DISCRIMINACIÓN SECUENCIAL CON ANIMALES ESTIMULADOS ELÉCTRICAMENTE EN LA CORTEZA INSULAR AGRANULAR POSTERIOR.**

48h después de finalizar la fase anterior, la mitad de los animales de ambos grupos (“positivo” y “control”) recibe una inyección de naloxona (4mg./ ml./ kg.) subcutánea 20 minutos antes de ser situados en la zona del corredor (laberinto Modelo 1) asociada a la estimulación y por la cual el grupo de animales “positivos” había mostrado preferencia. La otra mitad de los animales reciben una inyección de agua destilada 20 minutos antes de ser situados en la zona del laberinto con forma de corredor no asociada a la estimulación. Los animales permanecen en la zona del corredor asignada 20 minutos. Durante la estancia en la zona asociada a la estimulación ninguno de los animales recibe estimulación eléctrica. Al día siguiente, los animales que habían recibido la inyección de naloxona, reciben ahora agua destilada y son introducidos en la zona del laberinto en corredor asociada a la no estimulación y viceversa.

Por último, transcurridas las dos sesiones de adquisición, los animales fueron sometidos a un Test de preferencia por el lugar en dicho laberinto, registrando durante 10 minutos el tiempo de permanencia en cada una de las zonas del laberinto (zona asociada a la naloxona y zona asociada al agua destilada) (ver Figura 60 y Esquema 3).

|                          | DÍA 1  | DÍA 2  | DÍA 3: TEST ELECCIÓN                               |
|--------------------------|--|--|--|
| MITAD DE<br>LOS ANIMALES | Nx<br>+<br>20 min. en zona ST                  | H <sub>2</sub> O<br>+<br>20 min. en zona NO ST | Zona Nx      Zona H <sub>2</sub> O<br>(10 minutos) |
| MITAD DE<br>LOS ANIMALES | H <sub>2</sub> O<br>+<br>20 min. en zona NO ST | Nx<br>+<br>20 min. en zona ST                  | Zona Nx      Zona H <sub>2</sub> O<br>(10 minutos) |

**Esquema 3.** Diagrama que muestra el procedimiento conductual llevado a cabo en la Fase Experimental 4 del Experimento 6, en el que la administración de naloxona (Nx) es asociada a la zona del laberinto Modelo 1 previamente asociada a la estimulación eléctrica (ST) de la CI Agranular Posterior, y la administración de agua destilada (H<sub>2</sub>O) es asociada al otro lateral de dicho laberinto, en una tarea de condicionamiento de preferencia por un lugar.

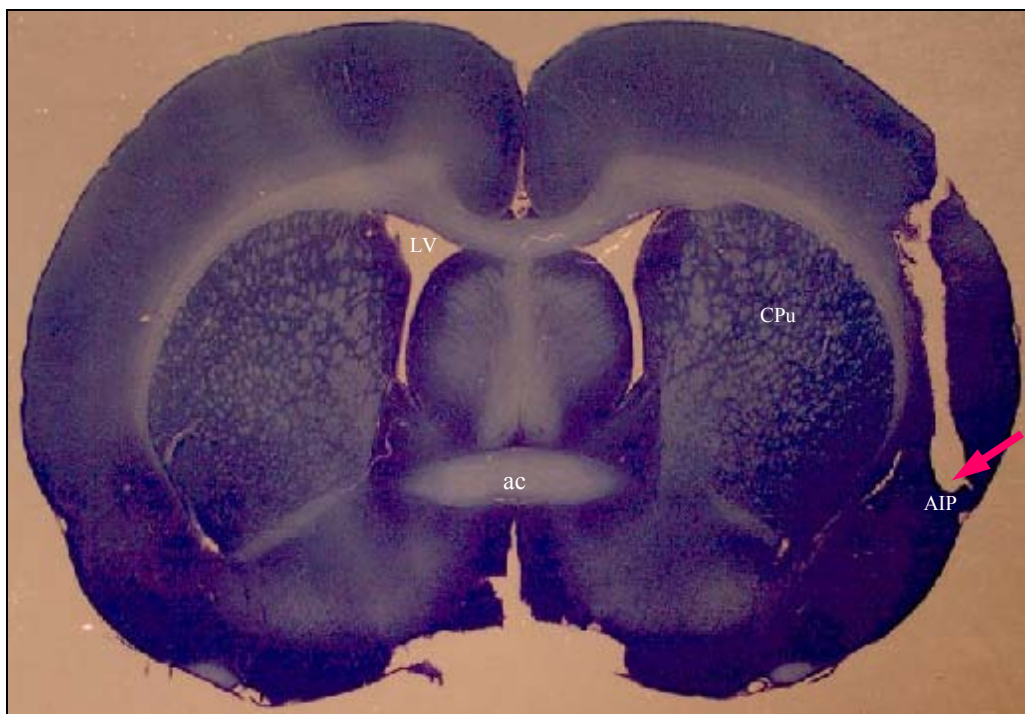


**Figura 60.** Procedimiento de aprendizaje de preferencias por un lugar utilizado para el estudio de las propiedades motivacionales inducidas por la administración de la naloxona en la zona del laberinto Modelo 1 previamente asociada a la estimulación eléctrica reforzante de la CI Agranular Posterior. Los animales son situados en un laberinto con dos áreas laterales bien diferenciadas (laberinto Modelo 1), en el lateral asociado a la estimulación de la CI los animales reciben naloxona y en el otro lateral, una inyección de agua destilada. En el Test de Elección, los animales, ahora sin ningún tratamiento, pueden elegir y permanecer en el lugar del laberinto que prefieran, registrándose el tiempo de permanencia en cada una de las zonas del laberinto (Adaptado de Camí y Farré, 2003).

Durante este periodo, al igual que en el caso anterior, los animales permanecieron en sus respectivas jaulas donde dispusieron durante 7 minutos de agua y de 14 g de alimento al finalizar cada sesión. Asimismo todas las fases conductuales se llevaron a cabo con ruido blanco de fondo para evitar sonidos imprevistos que pudieran alterar el comportamiento de los animales a lo largo del experimento.

## HISTOLOGÍA.

Este procedimiento se llevó a cabo de igual forma a la descrita en los experimentos anteriores. En la Figura 61 puede comprobarse la localización del tracto del electrodo en la Corteza Insular Posterior, en una sección transversal del cerebro de un animal perteneciente al grupo “positivo”.



**Fotografía 61.** Fotografía que muestra una sección transversal del cerebro de un animal representativo del grupo “positivo”, donde se comprueba la localización del tracto del electrodo. Abreviaturas: ac: Comisura Anterior; AIP: Corteza Insular Agranular Posterior; CPu: Caudado Putamen; LV: Ventrículo Lateral.



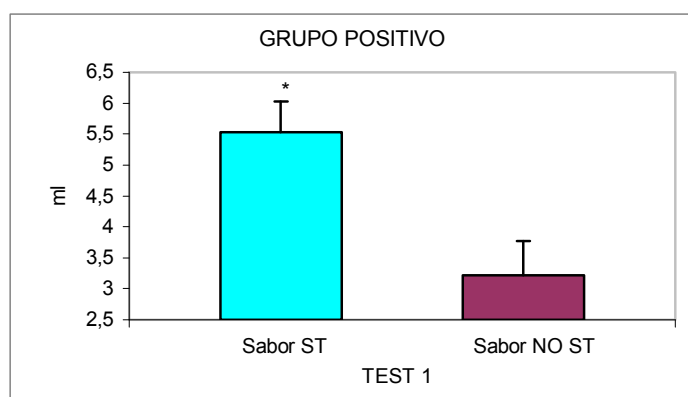
## RESULTADOS.

### **FASE 1:** *Modalidad concurrente del condicionamiento de preferencias por un lugar.*

Para la asignación de los animales a los distintos grupos se empleó el criterio establecido en el Experimento 1. En este caso, los sujetos fueron distribuidos en dos grupos, un grupo “positivo” formado por 9 animales, cuya estancia media (entre las sesiones de condicionamiento 2 y 3) en la zona asociada a la estimulación fue de 457.33 s., y un grupo “neutro” formado por 15 sujetos, con una permanencia media en la zona estimulada de 240.78 s. El grupo “control con falso implante” presentó un promedio de permanencia en la zona asociada a la estimulación de 277 s.

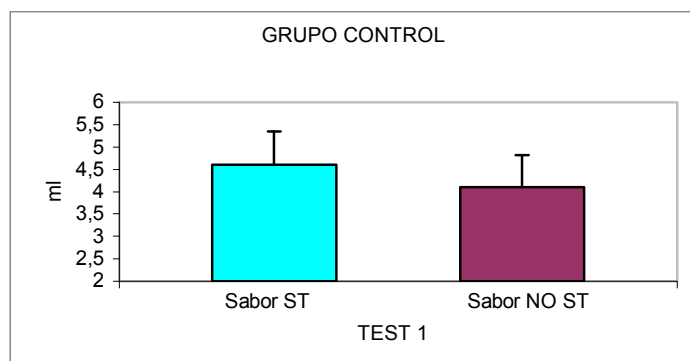
### **FASE 2:** *Aprendizaje de preferencias de una tarea de discriminación gustativa.*

**A) Prueba de Discriminación 1.** Para el análisis de los datos obtenidos en el grupo experimental “positivo” durante el Test de Discriminación Gustativa 1, se aplicó un ANOVA intra-sujeto, en el cual se comprobó que existen diferencias significativas entre el consumo del estímulo gustativo asociado a la estimulación y el sabor asociado a la no estimulación ( $F_{(1,8)} = 5.834$ ;  $p < 0.0422$ ) (ver Figura 62).



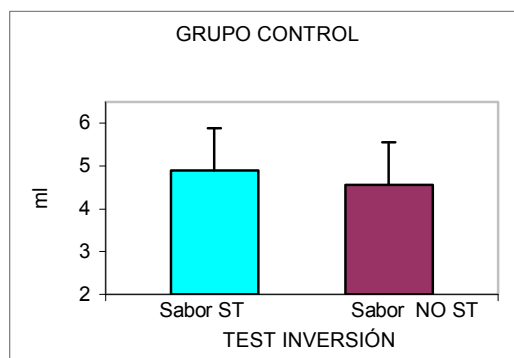
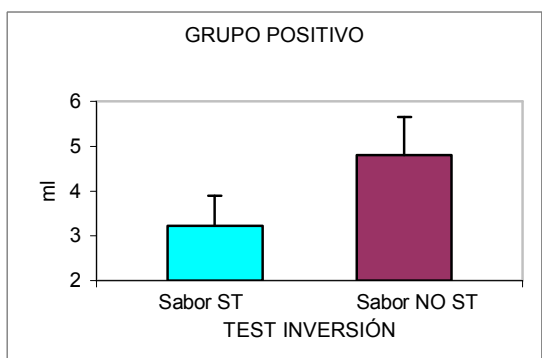
**Figura 62.** Efecto de la estimulación eléctrica de la Corteza Insular sobre la ingesta de diferentes estímulos gustativos (expresada en ml), en una tarea de aprendizaje de preferencias gustativas en contigüidad. Abreviaturas: Sabor ST, Sabor Estimulado; Sabor NO ST, Sabor No Estimulado. El asterisco (\*) representa las diferencias significativas entre los grupos a un nivel de significación  $< 0.05$ .

Por el contrario, el ANOVA intra-sujeto de los datos obtenidos por el grupo “control”, muestra que no existen diferencias significativas entre la ingesta de los dos estímulos gustativos ( $F_{(1,9)} = 0.126$ ;  $p > 0.05$ ) (ver Figura 63).



**Figura 63.** Ingesta (expresada en ml) de diferentes estímulos gustativos mostrada por los animales del grupo “control”, en una tarea de aprendizaje de preferencias gustativas en contigüidad. Abreviaturas: Sabor ST, Sabor Estimulado; Sabor NO ST, Sabor No Estimulado, aunque en ninguno de los casos los animales controles reciben estimulación.

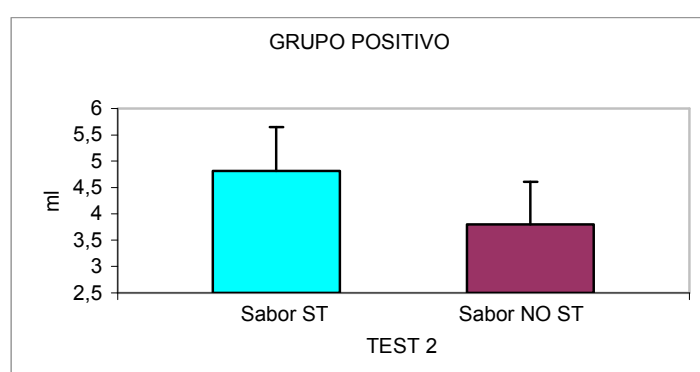
El análisis de los datos obtenidos por cada grupo en el Test de Inversión se llevó a cabo a través de un análisis de varianza intra-sujeto, en el cual se pudo comprobar que no existen diferencias en la ingesta de los dos estímulos gustativos presentados ni en el grupo “positivo” ( $F_{(1,8)} = 0.99$ ,  $p > 0.05$ ) (ver Figura 64) ni en el grupo “control” ( $F_{(1,9)} = 0.13$ ,  $p > 0.05$ ) (ver Figura 65). Es decir, en el Test de Inversión desaparecen las preferencias observadas en el grupo “positivo” hacia el sabor asociado a la estimulación.



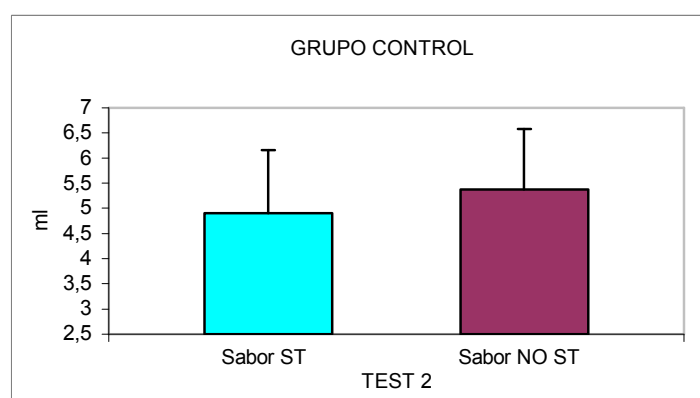
**Figuras 64 y 65.** Resultados obtenidos en el Test de Inversión con respecto a la ingesta (expresada en ml) de los estímulos gustativos (Sabor ST: Sabor Estimulado; y Sabor NO ST: Sabor No Estimulado) presentados a los animales de los grupos “positivo” (Figura 64, a la izquierda) y “control” (Figura 65, a la derecha), en una tarea de aprendizaje de preferencias gustativas de tipo no demorado.

### B) Prueba de Discriminación 2.

Por su parte, el análisis de los datos obtenidos por cada grupo, en el segundo Test de Discriminación Gustativa (Test 2) se llevó a cabo aplicando un ANOVA intra-sujeto. Los resultados muestran que tanto en el grupo “positivo” ( $F_{(1,8)} = 0.35$ ;  $p > 0.05$ ) (ver Figura 66) como en el “control” ( $F_{(1,9)} = 0.034$ ;  $p > 0.05$ ) (ver Figura 67), no existen diferencias significativas entre el consumo del estímulo gustativo asociado a la estimulación de la CI y el no estimulado.



**Figura 66.** Efecto de la estimulación eléctrica de la Corteza Insular sobre la ingesta (expresada en ml) de los dos estímulos gustativos (Sabor ST, Sabor Estimulado; Sabor NO ST, Sabor No Estimulado) presentados a los animales del grupo “positivo”, en la segunda tarea de aprendizaje de discriminación gustativa en contigüidad (Test 2).

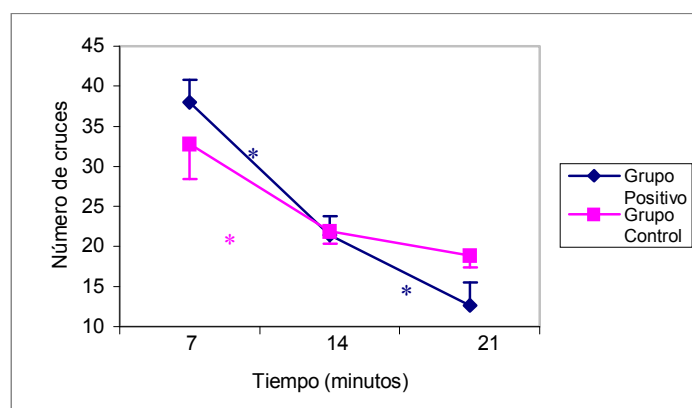


**Figura 67.** Representación gráfica de la ingesta (expresada en ml) de los dos estímulos gustativos presentados a los animales del grupo “control”, en la segunda tarea de aprendizaje de discriminación gustativa en contigüidad (Test 2). Abreviaturas: Sabor ST: Sabor Estimulado; Sabor NO ST: Sabor No Estimulado.

### **FASE 3: Registro de la actividad locomotora en el laberinto Modelo 1.**

Para el análisis de los distintos parámetros conductuales registrados en esta fase, número de cruces y número de respuestas de alzada, se aplicó un análisis de varianza entre grupos (Grupo x Tiempo), contando la variable grupo con dos niveles (“positivo” y “control”) y la variable tiempo con tres niveles (7 minutos, 14 minutos y 21 minutos).

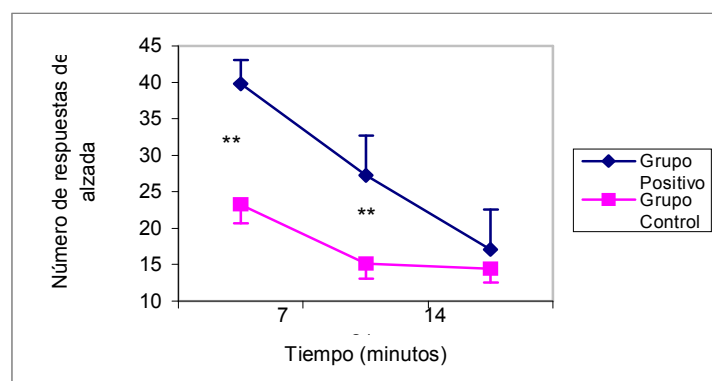
El resultado obtenido con respecto a la actividad horizontal (número de cruces), muestra que no existen diferencias entre los grupos según el factor tiempo ( $F_{(2,34)} = 3.04$ ;  $p > 0.05$ ) (ver Figura 68), pero si existe un efecto significativo de éste último factor ( $F_{(2,34)} = 37.65$ ;  $p < 0.01$ ). Al analizar el efecto principal del factor tiempo mediante un análisis post hoc Newman-Keuls, se encuentran diferencias significativas entre todos los niveles del factor tiempo ( $p < 0.025$ ) excepto entre los niveles 14 min.-21min. del grupo “control” ( $p = 0.62$ ).



**Figura 68.** Representación gráfica del número de cruces efectuados por los animales del grupo “positivo” (en ausencia de estimulación) (en color azul) y del grupo “control” (en color rosa), a lo largo del tiempo. El asterisco (\*) representa las diferencias significativas entre los niveles del factor tiempo (0.05), en cada uno de los grupos (\*, en el grupo “control”; y \*, el grupo “positivo”).

Por lo que se refiere a la actividad vertical o número de “rearings”/ respuestas de alzada, los datos obtenidos muestran que existen diferencias significativas entre los grupos en el número de “rearings”/ respuestas de alzada en función del factor tiempo ( $F_{(2,34)} = 3.803$ ;  $p < 0.0323$ ) (ver Figura 69). Al analizar la interacción mediante un análisis post hoc Newman-Keuls, encontramos diferencias significativas entre los grupos en los

niveles del factor tiempo 7 minutos y 14 minutos ( $p < 0.01$ ), eliminándose las diferencias entre el grupo “positivo” y el “control” en el nivel 21 minutos ( $p > 0.05$ ). En el caso del grupo “positivo”, existen diferencias significativas en todos los niveles del factor tiempo ( $p < 0.01$ ), no encontrándose diferencias en el grupo “control” ( $p > 0.05$ ) (ver Figura 69).



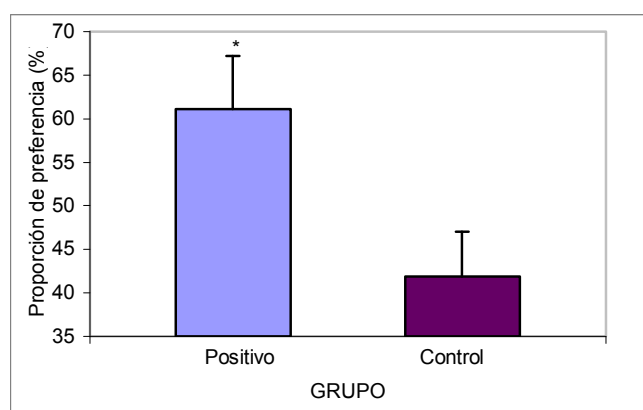
**Figura 69.** Representación gráfica del número de respuestas de alzada mostrado por los animales del grupo “positivo” (en ausencia de estimulación) (en color azul) y del grupo “control” (en color rosa), a lo largo del tiempo. Los asteriscos \*\*, muestran las diferencias significativas entre los dos grupos ( $p < 0.01$ ).

#### **FASE 4:** *Naloxona y evitación/ preferencia por un lugar en una tarea de discriminación secuencial con animales estimulados eléctricamente en la Corteza Insular Agranular Posterior.*

Para el análisis de los datos obtenidos en el Test de CPP se determinó la proporción de preferencia manifestada por el lugar asociado a la administración de agua destilada. Este valor se obtuvo dividiendo el tiempo que cada animal ocupó en la zona del corredor de preferencia asociada al agua destilada, entre el tiempo transcurrido por el animal en esa zona más el tiempo de permanencia en la zona del corredor asociada a la administración de naloxona, todo ello multiplicado por 100, es decir:

$$\text{Proporción de preferencia} = \frac{\text{Tiempo en zona de Agua Destilada (s)}}{\text{Tiempo en zona de Agua Destilada (s)} + \text{Tiempo en zona de Nx (s)}} \times 100$$

Con los datos obtenidos se aplicó un ANOVA unifactorial entre grupos que mostró diferencias significativas en la proporción de preferencia según el grupo ( $F_{(1, 17)} = 5.31$ ;  $p < 0.034$ ) (ver Figura 70). Como se aprecia en la siguiente gráfica, los animales del grupo “positivo” pasan una mayor parte del tiempo en la zona del laberinto asociada a la administración del agua destilada, una zona no elegida durante la prueba de inducción de preferencias por la estimulación eléctrica de la CI.



**Figura 70.** Representación gráfica de la proporción de preferencia por la zona del laberinto asociada a la administración de agua destilada [Tiempo en zona de Agua Destilada / (Tiempo en zona de Agua Destilada + Tiempo en zona de Nx) x 100], mostrada por los animales del grupo “positivo” (en color azul) y del grupo “control” (en color morado). El asterisco \*, muestra las diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la inducción de preferencias gustativas tras la activación de la Corteza Insular Agranular Posterior, en una tarea de discriminación en contigüidad inter-estimular. Investigaciones previas en nuestro laboratorio ya habían puesto de manifiesto esta posibilidad aunque en aquella ocasión utilizando pruebas de aprendizaje demorado (Cubero y Puerto, 2000), por lo que junto con los resultados obtenidos en este trabajo, estos estudios sugieren inicialmente que esta estructura cortical podría ser relevante de alguna manera en el aprendizaje interoceptivo independientemente de los requerimientos temporales y de la modalidad de aprendizaje (demorada/ explícita o contigua/ implícita).

Sin embargo, los datos obtenidos en el Test de Inversión (una prueba de aprendizaje flexible), muestran que los animales son incapaces de transferir dicho aprendizaje a una nueva condición en la que se ha modificado la localización espacial (derecha/ izquierda) del estímulo gustativo asociada a la estimulación de la CI. Este resultado negativo podría ser explicado en términos de una asociación débil entre los estímulos, aunque al duplicar el número de ensayos de adquisición en la tarea de aprendizaje discriminativo se produce una pérdida del efecto reforzante. En este segundo Test de Elección los animales no diferencian significativamente sus preferencias entre el estímulo gustativo asociado a la estimulación y el sabor no estimulado.

Este resultado contradictorio (y llamativo) motivó la realización de diversas pruebas que permitieran explicar los resultados obtenidos y así, en la fase 3, se registraron dos índices de la respuesta motora: el número de las respuestas de alzada o “rearings” (actividad vertical), y el número de cruces (actividad horizontal) que los animales realizan al pasar de un área a otra del laberinto con forma de corredor, dos manifestaciones comportamentales que otros autores habían relacionado con manifestaciones de sensibilización/ tolerancia en los casos de administración de drogas de abuso. En efecto, los resultados obtenidos muestran que en el grupo “positivo” se produce un incremento en la actividad locomotora vertical de los animales que se manifiesta por un aumento en el número de respuestas de alzada (“rearings”), sin que se vea afectado el número de cruces.

En la fase 4, por su parte, se ha comprobado que, en ausencia de estimulación eléctrica concurrente, la administración de naloxona de manera asociada a la estancia de los animales en la zona del laberinto que había sido relacionada con los efectos reforzantes de la estimulación, provoca ahora en los animales del grupo “positivo”, un estado motivacional aversivo que se manifiesta con la evitación de esa zona del laberinto. Este resultado no puede explicarse en función del efecto aversivo de la administración de naloxona por sí sola, ya que la asociación de una zona del laberinto a la administración de la misma dosis de naloxona en el grupo “control”, no desencadena esta respuesta de evitación. Estos últimos animales muestran una conducta de preferencia similar por ambas áreas (naloxona vs. agua destilada).

De acuerdo con el orden teórico seguido en el planteamiento anterior, un primer punto a explicar es el relacionado con la participación implícita o explícita de la Corteza Insular en el aprendizaje de preferencias gustativas, cuestión controvertida que permanece

aún sin resolver. Así, en distintos estudios conductuales llevados a cabo en nuestro laboratorio se ha comprobado que las lesiones del Córtex Insular Posterior no impide la adquisición del aprendizaje aversivo gustativo concurrente (Cubero, 1995), y al mismo tiempo, la estimulación eléctrica de esta región induce una clara preferencia por los estímulos gustativos novedosos con los que ha sido asociada, en una tarea de aprendizaje gustativo demorada (secuencial/ explícito) (Cubero y Puerto, 2000).

Inicialmente estos datos relacionan a la Corteza Insular con el aprendizaje a largo plazo (explícito), en el que una de sus características principales es la flexibilidad (Petri y Mishkin, 1994; Reber et al., 1996). En este sentido, investigaciones llevadas por nuestro Grupo de Investigación demuestran que el aprendizaje aversivo gustativo puede establecerse mediante dos modalidades de aprendizaje, secuencial (explícito) y concurrente (implícito) (Gallo et al., 1988; 1990; 1991; Arnedo et al., 1990; 1991; 1993; Agüero et al., 1993a, b; 1997; Mediavilla et al., 2000; 2001a; Cubero y Puerto, 2000b; Cubero et al., 2001). Solo aquellos animales que aprenden mediante un procedimiento demorado o secuencial, son capaces de transferir ese aprendizaje a nuevas situaciones en las que las condiciones experimentales cambian, por ejemplo en un Test de Inversión, poniendo de manifiesto así el carácter explícito del aprendizaje (Petri y Mishkin, 1994; Reber et al., 1996; Mediavilla et al., 2001, 2005; Eichenbaum, 2002). Por el contrario, los animales que desarrollan el aprendizaje a través de un procedimiento concurrente no logran trasladar lo adquirido a las exigencias del Test de Inversión (Mediavilla et al., 2001).

Los resultados negativos obtenidos en el Test de Inversión del presente estudio sugieren sin embargo, que el aprendizaje de preferencias obtenido, es poco flexible. Esta conclusión podría ser explicada por el hecho de que ha sido un aprendizaje débil y por esto los animales tienen dificultad para transferirlo ante un cambio en las contingencias experimentales.

Cabe la posibilidad de que estos resultados contradictorios puedan explicarse en el sentido propuesto por autores como Petri y Mishkin (1994) quienes consideran que “lo que se aprende depende de cómo se aprende”, y para lo cual se dispone de sistemas neuroanatómicos diferentes y apropiados para los distintos tipos de aprendizaje y de memoria. Por tanto, si el procedimiento experimental utilizado implica que la información sea procesada y adquirida según la modalidad implícita o en términos de estos autores, cuando se ha aprendido la probabilidad de que un estímulo pueda elicitarse una respuesta, ésta será almacenada en un sistema de memoria determinado, “el sistema de hábitos”, de



forma que para tener acceso adecuado a dicha información será necesario que las condiciones sean similares a las establecidas durante la adquisición. De acuerdo con este planteamiento, los resultados obtenidos en el Test de Inversión son los que cabría esperar. Si, por el contrario, el procedimiento experimental utilizado permite al animal la adquisición de una representación relacional/ explícita de los estímulos y sus posibles asociaciones, esta información puede quedar almacenada en el “sistema de memoria cognitivo” permitiendo una mayor flexibilidad para transferir el conocimiento adquirido ante nuevas situaciones (Petri y Mishkin, 1994).

Por otra parte, el efecto observado en la prueba de Inversión, apunta de nuevo a una mayor tendencia al establecimiento de asociaciones entre los índices espaciales o propioceptivos y la estimulación de la CI, mas que a asociar los estímulos gustativos y la activación de esta estructura. De hecho, otros estudios han demostrado también que la Corteza Insular Agranular puede desempeñar un papel fundamental en el establecimiento de asociaciones entre reforzadores naturales (como el chocolate) o artificiales (como la morfina, la nicotina) y los índices contextuales, de modo que la activación de esta estructura se produce específicamente ante la presencia del contexto asociado a la administración de las sustancias psicoactivas (Schroeder et al., 2001; Schroeder y Kelley, 2002).

Con respecto a la persistencia de la acción reforzante inducida por la estimulación eléctrica de la CI Agranular Posterior se ha comprobado que cuando se incrementa el número de ensayos de adquisición, sin modificar los parámetros de estimulación, se produce una sorprendente pérdida del efecto reforzante. Este hecho no sucede en el caso de la autoestimulación eléctrica intracerebral, en el que se ha observado repetidamente que los animales mantienen su capacidad, durante horas en días sucesivos, para obtener la estimulación eléctrica reforzante a través de distintas áreas cerebrales (Shizgal y Murray, 1989; Bozarth, 1994).

Cabe la posibilidad de que el deterioro del efecto reforzante obtenido tras la activación repetida de la Corteza Insular, se haya podido producir como resultado de un proceso similar al fenómeno de tolerancia que se genera habitualmente tras la administración de algunas sustancias de abuso (Lieblich et al., 1991; Di Chiara y North, 1992; Mao, 1999; van Ree et al., 1999; Mitchell et al., 2000; Narita et al., 2001;

Shippenberg et al., 2001; Taylor y Fleming, 2001; Vetulani, 2001; Bodnar y Hadjimarkou, 2003; Gerrits et al., 2003; Koob y Le Moal, 2006). Dada la gran cantidad de receptores opiáceos localizados en esta región cortical (Mansour et al., 1994; García et al., 1995; Svingos et al., 1995; Burkey et al. 1996; Burkey et al. 1999; Izenwasser et al., 1999; Allen et al., 2003) cabe la posibilidad de que el efecto reforzante de la estimulación eléctrica de la Corteza Insular pueda deberse a la presencia de estos opiáceos endógenos, con lo cual no puede descartarse la aparición de un efecto de tolerancia inducido ahora por la estimulación repetida de la CI. La administración de forma continuada de sustancias de abuso como la morfina, los cannabinoides o los psicoestimulantes, puede llegar a provocar: a) tolerancia hacia algunos de los efectos que provocan, por ejemplo la analgesia; b) dependencia física y/ o psíquica, que se manifiesta a través de la aparición de los síntomas del síndrome de retirada o abstinencia, y/ o la presencia de ansia/ “craving” o necesidad imperiosa de consumir dicha sustancia; mientras que, si la administración es discontinua, c) puede provocar un aumento o sensibilización de la respuesta locomotora (sensibilización conductual) así como de las propiedades reforzantes que estas sustancias poseen (Bakshi y Kelley, 1994; Herz y Spanagel, 1995; Bell et al., 1997; Hamamura et al., 1997; Bernstein y Welch, 1998; Mao, 1999; van Ree et al., 1999; Mitchell et al., 2000; Drouin et al., 2002; Everitt et al., 2001; Narita et al., 2001; Taylor y Fleming, 2001; De Vries y Shippenberg, 2002; Maldonado, 2002; Avena y Hoebel, 2003; Bodnar y Hadjimarkou, 2003; Gerrits et al., 2003; Viganò et al., 2003; Sun y Dalman, 2003; Koob y Le Moal, 2006).

El fenómeno de la tolerancia y los correspondientes síntomas de dependencia que le acompañan surgen, al menos en parte, como resultado de adaptaciones compensatorias ante la administración de las drogas. En ausencia de estas drogas, estas neuro-adaptaciones se hacen evidentes y pueden reflejarse por la aparición de síntomas generalmente opuestos a los provocados por la administración inicial de estas sustancias (abstinencia). En animales, como se indicaba mas arriba, estos síntomas incluyen signos somáticos como diarrea, rinorrea, rechinar de los dientes, temblores, etc., o manifestaciones conductuales que incluyen cambios en la conducta exploratoria, tendencia a conductas de escape (saltos), incremento en la actividad locomotora vertical (número de “rearings”/ respuestas de alzada), posturas anormales, sacudidas del lomo entre otras, y que reflejan los síntomas afectivos aversivos asociados con la abstinencia a los opiáceos (Koob et al., 1993; Kreek y Koob, 1998; Liu et al., 1999; Tzchentke y Schmidt, 1999; Berke y Hyman, 2000; Stinus et al., 2000; Hamlin et al., 2001; Narita et al., 2001; Sinchaisuk et al., 2002; Zhou et al., 2003).

Siguiendo este planteamiento, en el presente estudio se ha examinado la posibilidad de que los animales se hubieran podido encontrar en un estado de privación o abstinencia, provocado por la ausencia de los efectos reforzantes derivados de la estimulación eléctrica de la Corteza Insular. Así es sabido que tras la administración repetida de morfina, su ausencia puede provocar un descenso en la ingesta así como en la preferencia mostrada por soluciones apetitosas con las que es asociada (Lieblich et al., 1991) y también que los síntomas del síndrome de abstinencia pueden aparecer tanto por el cese brusco en el consumo de estas sustancias como por la administración de un antagonista opiáceo como la naloxona (van Ree et al., 1999; Narita et al., 2001; Parker et al., 2002; Gerrits et al., 2003). En este estudio se han examinado las consecuencias conductuales ambas manipulaciones experimentales.

Se han analizado los efectos de la posible abstinencia espontánea provocada por la ausencia de estimulación a través de los cambios en la conducta locomotora horizontal (contabilizando el número de cruces que realiza el animal al pasar de una zona a otra del laberinto) (Balcells-Olivero y Vecina, 1997; Bell et al., 1997; Hamamura et al., 1997; Tzschentke y Schmidt, 1999; Chefer et al., 2000; Bradley y Meisel, 2001; Viganò et al., 2003); y la conducta locomotora vertical o número de “rearings”/ respuestas de alzada (Balcells-Olivero y Vecina, 1997; Hamamura et al., 1997; Tzschentke y Schmidt, 1999; Chefer et al., 2000; Roitman et al., 2002; Viganò et al., 2003). Aunque ambas manifestaciones conductuales han sido consideradas como respuestas relacionadas la administración de sustancias de abuso, investigaciones llevadas a cabo mediante la administración de antagonistas opiáceos han demostrado que sólo los “rearings”/ respuestas de alzada, serían representativos de la implicación de mecanismos opiáceos (Balcells-Olivero y Vecina, 1997).

Los resultados obtenidos demuestran que los animales que han recibido en repetidas ocasiones estimulación reforzante de la CI, ahora en ausencia de ésta, muestran una mayor actividad exploratoria que se manifiesta por un aumento en la actividad locomotora vertical (o “rearings”) por comparación al grupo “control”; no existiendo diferencias significativas entre los grupos con respecto a la actividad locomotora horizontal (número de cruces que se producen al pasar de una zona a otra del laberinto).

Por otra parte, distintas investigaciones han demostrado que la administración discontinua de sustancias de abuso como los opiáceos, la cocaína o las anfetaminas puede provocar un aumento en la denominada sensibilización conductual hacia determinados

efectos de la droga, que se puede manifestar a través de la actividad locomotora (Hamamura et al., 1997; Pierce y Kalivas, 1997; Mao, 1999; Tzschentke y Schmidt, 1999; Chefer et al., 2000; Drouin et al., 2002; Wyvell y Berridge, 2001; Everitt y Wolf, 2002; Fernández-Espejo, 2002; Avena y Hoebel, 2003; Viganò et al., 2003; Yoo et al., 2003). Este efecto comportamental sería el reflejo de los cambios estructurales y morfológicos que la administración intermitente de drogas provoca en el sistema nervioso central, y más concretamente, en los sistemas cerebrales relacionados con la recompensa (Pierce y Kalivas, 1997; Robinson y Kolb, 1997, 1999a; Berridge y Robinson, 1998; Berke y Hyman, 2000; Robinson y Berridge, 2000, 2003; Everitt et al., 2001; Hyman y Malenka, 2001; Shippenberg et al., 2001; Everitt y Wolf, 2002; Fernández-Espejo, 2002; Robinson et al., 2002; Bonci et al., 2003).

Siguiendo este planteamiento, existe la posibilidad de que la estimulación eléctrica de la CI haya podido inducir una sensibilización en el circuito cerebral implicado en la recompensa, cuyo resultado ha sido un aumento de alguno de los componentes de la conducta locomotora de estos animales. De hecho, este efecto suele verse incrementado cuando los animales son situados en presencia de los índices del entorno que previamente (en la primera fase del experimento) habían estado asociados al efecto de las drogas (o en nuestro caso, la activación de esta estructura) (Anagnostaras y Robinson, 1996; Berke y Hyman, 2000; Robinson y Berridge, 2003; Robinson y Kolb, 2004).

En este contexto es sabido que la administración de naloxona a animales, que han sido expuestos a los efectos reforzantes de la morfina, induce estados afectivos negativos que pueden manifestarse por ejemplo, en tareas de aprendizaje discriminativo y/ o espacial, por una evitación / aversión hacia los estímulos con los que han sido asociados (McDonald et al., 1997; Erdtmann-Vourliotis et al., 1998; Blokhina et al., 2000; Lowe et al., 2002; Parker et al., 2002; Kawasaki et al., 2005). Los resultados obtenidos en la última fase de esta serie experimental demuestran que la administración de naloxona, en animales expuestos a la estimulación eléctrica de la CI posterior, provoca un estado motivacional aversivo capaz de inducir evitación o aversión por las claves espaciales con las que ha sido asociada. Un resultado que no puede ser atribuido en exclusiva a la acción de la naloxona, puesto que en el grupo “control” no se produce este efecto.

Investigaciones previas llevadas a cabo con técnicas de neuro-imagen sugieren también la implicación de la CI en el síndrome de abstinencia a la morfina cuando es “precipitado” por la administración de naloxona (Erdtmann-Vourliotis et al., 1998; Lowe et

al., 2002). Estos estudios demuestran que la administración de naloxona en ratas pre-tratadas con morfina provoca los síntomas conductuales propios del síndrome de abstinencia a opiáceos, mientras que a nivel neural supone la activación de distintas estructuras entre las que se encuentra la Corteza Insular (Erdtmann-Vourliotis et al., 1998; Lowe et al., 2002).

En resumen, los resultados obtenidos en esta investigación reproducen de nuevo que la estimulación eléctrica de un área implicada en el procesamiento de la información víscero-sensorial, como la Corteza Insular, induce preferencias por los estímulos espaciales y gustativos con los que es asociada (Fase 1 y 2). Sin embargo, de acuerdo con los datos obtenidos en la segunda fase de este estudio, este efecto se reduce al aumentar el número de ensayos de adquisición. Esta pérdida del efecto reforzante va acompañada de un aumento en la actividad locomotora vertical (o “rearings”/ respuestas de alzada) de los animales (Fase 3). Asimismo, la administración de naloxona, un antagonista opiáceo, induce un estado motivacional aversivo que se manifiesta por un rechazo por el lugar del laberinto que previamente había sido preferido (Fase 4). En conjunto estos resultados podrían ser similares a los efectos y a las consecuencias aversivas derivadas de la administración repetida de algunas sustancias de abuso. Para estudiar esta potencial característica de los efectos reforzantes de la estimulación repetida de la CI, se diseñó el siguiente experimento.

**CAPÍTULO VI: REDUCCIÓN EN LA EFICACIA  
REFORZANTE INDUCIDA POR LA  
ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA REPETIDA DE LA  
CORTEZA INSULAR AGRANULAR POSTERIOR.**



---

## **EXPERIMENTO 7: Reducción en la eficacia reforzante inducida por la estimulación eléctrica repetida de la Corteza Insular Agranular Posterior.**

---

La estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular Posterior genera preferencias por los estímulos con los que es asociada, tanto en tareas de condicionamiento de preferencias por un lugar como en aprendizajes discriminativos gustativos. Sin embargo, en el experimento anterior un incremento en el número de ensayos de adquisición, no mejoró y consolidó el aprendizaje sino que, por el contrario, provocó una reducción significativa en el efecto de preferencia obtenido. Esta disminución no se produce en el caso de la conducta de autoestimulación eléctrica intracerebral, la cual, una vez adquirida permanece constante, es decir, que los animales mantienen su fase de respuesta (presionar la palanca en una caja de Skinner) a lo largo del tiempo (horas, días, semanas) (Bozarth, 1994).

Los resultados descritos en el estudio previo se asemejan mas a los obtenidos tras la administración repetida de las sustancias de abuso (Lieblich et al., 1991; Mao, 1999; van Ree et al., 1999; Mitchell et al., 2000; Narita et al., 2001; Shippenberg et al., 2001; Taylor y Fleming, 2001; Vetulani, 2001; Bodnar y Hadjimarkou, 2003; Gerrits et al., 2003; Hyman et al., 2006; Koob y Le Moal, 2006). Parece pues que el resultado de la estimulación de la CI, podría explicarse en términos de tolerancia. En efecto, la tolerancia es un fenómeno que se observa habitualmente en los casos de administración repetida de sustancias como los opiáceos, cannabinoides, los psicoestimulantes, etc., y que podría definirse como un descenso en la respuesta a la dosis de un fármaco administrado repetidamente o también en la necesidad de incrementar la citada dosis para obtener el efecto inicial (Taylor y Fleming, 2001; Vetulani, 2001; Koob y Le Moal, 2006). En los casos de la tolerancia opiácea, ésta última aparece con respecto a los efectos reforzantes, analgésicos, sedativos que estas sustancias ejercen (Herz y Spanagel, 1995; Poulos y Cappel, 1991; Vetulani, 2001; Camí y Farré, 2003; Hyman et al., 2006; Koob y Le Moal, 2006).



Investigaciones llevadas a cabo tanto en seres humanos como en animales de laboratorio, han demostrado que el desarrollo de la tolerancia está en función de la dosis de la sustancia administrada, pero también es dependiente de otros factores como el patrón de uso y el contexto (Siegel, 1999; Siegel y Kim, 2000; Vetulani, 2001; Siegel y Ramos, 2002; Koob et al., 2004; Robinson y Kolb, 2004; Koob y Le Moal, 2006). Concretamente, la administración de sustancias de abuso, como los opiáceos, siguiendo un patrón continuo, favorece el desarrollo de la tolerancia en relación con determinadas manifestaciones, como puede ser la analgesia o el refuerzo. Mientras que, por el contrario, la administración discontinua o intermitente, suele estar relacionada en mayor medida con la aparición del fenómeno conocido como sensibilización (Kreek y Koob, 1998; Viganò et al., 2003; Hyman et al., 2006; Koob y Le Moal, 2006).

Por otra parte, tanto en el caso de la tolerancia como en el de la dependencia, los mecanismos de aprendizaje de tipo asociativo desempeñan un papel fundamental (Siegel, 1999; Siegel y Kim, 2000; Everitt et al., 2001; See, 2002; Siegel y Ramos, 2002; Ghitza et al., 2003; Robinson y Kolb, 2004). Así, se considera que las respuestas fisiológicas compensatorias que se originan para contrarrestar los efectos provocados por la administración de las drogas suelen asociarse a los distintos índices contextuales que han estado relacionados con esta sustancia. A partir de aquí, la mera presencia de los índices asociados a la administración de la droga, puede provocar la aparición de aquellas respuestas compensatorias. Estas respuestas son generalmente de carácter opuesto a los efectos inducidos por las sustancias, originando así el fenómeno de tolerancia en presencia de la administración de la droga, o los síntomas de abstinencia si se presentan en ausencia de la sustancia (Siegel, 1999; Siegel y Ramos, 2002). Para el análisis de estos procesos se utilizan pruebas experimentales como el CPP, uno de los procedimientos más utilizados para el estudio de los efectos motivacionales reforzantes y aversivos inducidos por las drogas (Bechara et al., 1992; Nader et al., 1996; Tzschentke, 1998; Narita et al., 2001; Parker et al., 2002; Camí y Farré, 2003; Gerrits et al., 2003). De acuerdo con estos datos, el objetivo del presente estudio será comprobar si la estimulación eléctrica repetida de la Corteza Insular Agranular Posterior, siguiendo un patrón de administración diario, puede originar un descenso en el efecto reforzante inducido en una tarea de aprendizaje de condicionamiento de preferencia por un lugar (CPP).

## **MÉTODO.**

### **SUJETOS.**

En este experimento se utilizaron 40 ratas albinas, de raza Wistar, suministradas por el Estabulario de la Universidad de Granada, y cuyo peso al inicio del experimento, osciló entre 270 y 330 g.

A su llegada al laboratorio, los animales fueron distribuidos de forma aleatoria, en dos grupos independientes, un grupo implantado con un electrodo intracerebral (formado por 31 animales) y un grupo control intacto constituido por 9 animales.

Hasta el inicio del protocolo experimental, estos animales se mantuvieron en el laboratorio en las condiciones descritas en el apartado de Método del Experimento 1.

### **INSTRUMENTOS.**

Las jaulas empleadas para instalar a los animales así como el instrumental utilizado durante el procedimiento quirúrgico fueron los mismos que los empleados en los experimentos anteriores (ver apartado de Instrumentos del Capítulo I de esta Tesis Doctoral).

El equipo empleado para administrar y monitorizar la corriente eléctrica, así como el necesario para llevar a cabo la histología, fue también el mismo que el descrito en los experimentos anteriores.

Para el condicionamiento espacial se utilizó el laberinto con forma de corredor (Modelo 1) descrito en los experimentos anteriores (ver detalles en el Experimento 1 de esta Tesis Doctoral y Figura 23).

### **PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.**

El procedimiento quirúrgico fue idéntico al descrito anteriormente.

## **PROCEDIMIENTO CONDUCTUAL.**

Antes de iniciar el procedimiento conductual, tres de los animales tuvieron que ser excluidos del estudio porque mostraban conductas de giro.

### ***FASE 1: CONDICIONAMIENTO CONCURRENTE DE PREFERENCIA POR UN LUGAR (CPPc) EN EL LABERINTO CON FORMA DE CORREDOR (MODELO 1).***

*Fase de fijación de la intensidad de la corriente eléctrica apropiada.*

Esta fase se realizó de forma similar a la descrita en los experimentos anteriores, estableciendo así la intensidad de la estimulación adecuada para cada animal que, en este caso, osciló entre 70 y 385  $\mu$ A.

#### *CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIA.*

En este periodo todos los animales fueron examinados en una prueba de condicionamiento concurrente por un lugar durante dos sesiones de adquisición (de 10 minutos cada una) en días sucesivos, de un modo similar al procedimiento llevado a cabo en el laberinto en corredor descrito en el Experimento 1. Con los 9 animales intactos se siguió el mismo procedimiento, sin que en ningún caso recibieran estimulación eléctrica.

En función del tiempo de permanencia de los sujetos experimentales en cada una de las zonas del laberinto y aplicando el criterio de distribución de los animales (descrito en el Experimento 1), éstos se distribuyeron en dos grupos, uno formado por 16 animales que mostraban una consistente preferencia por el lugar asociado a la estimulación eléctrica de la CI Agranular (grupo “positivo”); y otro grupo con 12 ratas que mostraban indiferencia por cualquiera de las áreas del laberinto (grupo “neutro implantado”). A partir de este momento, los animales del grupo neutro implantado pasan a ser utilizados como animales controles y no vuelven a recibir estimulación eléctrica en ninguna de las fases experimentales posteriores.

---

***FASE 2: CONDICIONAMIENTO CONCURRENTES DE PREFERENCIA POR UN LUGAR (CPPc) EN EL LABERINTO CON FORMA DE CORREDOR (MODELO 1): ESTABLECIMIENTO DE LA LÍNEA DE BASE.***

Antes de iniciar esta segunda fase experimental los 16 animales que mostraron preferencias por el lugar asociado a la estimulación, fueron asignados de forma aleatoria a dos grupos, constituidos por 8 animales cada uno (**Grupo “Positivo 1”** y **Grupo “Positivo 2”**).

Asimismo, los animales controles intactos y los “neutrales implantados”, fueron asignados de manera aleatoria a dos grupos, constituyendo un **Grupo “Control 1”**, formado por 4 animales intactos y 6 animales neutrales implantados; y otro **Grupo “Control 2”**, constituido por 5 animales intactos y 6 animales neutrales implantados.

Una vez establecidos los grupos, todos los animales fueron sometidos a una sesión de condicionamiento de preferencia por un lugar en el laberinto Modelo1, manteniendo la misma localización espacial que en la fase anterior, que fue considerada como línea de base.

***FASE 3: ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA REPETIDA DE LA CI AGRANULAR.***

**A.** 24 horas después del establecimiento de la línea de base, los animales son introducidos en la zona del laberinto Modelo 1 asociada a la estimulación eléctrica de la CI y permanecen allí durante 10 minutos. Solo el grupo “Positivo 1” recibe estimulación eléctrica de la CI durante ese periodo de tiempo.

**B.** 24 horas después de la prueba anterior (A), todos los animales son sometidos a una sesión de CPP concurrente en el mismo laberinto. En este caso, los animales de los grupos “Positivos 1 y 2”, son estimulados cuando entran en la zona del laberinto asociada a la estimulación. Los grupos “Controles” no reciben estimulación en ningún caso.

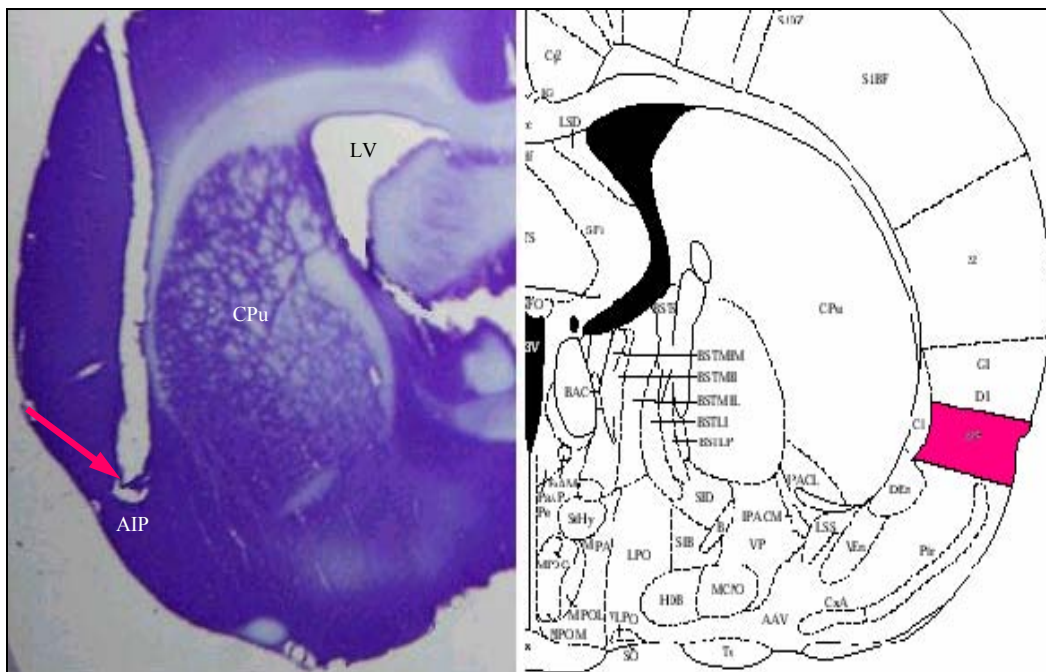
Este procedimiento alternante se lleva a cabo en **tres ocasiones**, de forma que los animales permanecen 3 días en la zona del laberinto asociada a la estimulación alternado con 3 sesiones de CPPc en dicho laberinto.

***FASE 4: RECUPERACIÓN DEL EFECTO DE PREFERENCIA POR UN LUGAR MEDIANTE EL INCREMENTO DE LA INTENSIDAD DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE LA CORTEZA INSULAR AGRANULAR.***

Transcurridas 24 horas desde la última fase, todos los animales son sometidos de nuevo a una sesión de CPPc similar a la anterior, pero en esta ocasión la intensidad de la corriente utilizada para la activación de la CI de los animales de los grupos “Positivo 1 y 2”, se incrementó en un 15 %.

**HISTOLOGÍA.**

Este procedimiento se llevó a cabo de idéntica manera a la descrita en los experimentos anteriores. En la Figura 71 se puede comprobar la localización del electrodo implantado en la Corteza Insular Agranular de uno de los animales pertenecientes al grupo “Positivo 1”.



**Figura 71.** Fotografía que muestra una sección transversal del cerebro de uno de los animales representativos del Grupo “Positivo 1” donde se comprueba la localización del tracto del electrodo. La Corteza Insular Agranular Posterior aparece coloreada en rosa en la lámina derecha. Abreviaturas: AIP: Corteza Insular Agranular Posterior; CPu: Caudado Putamen; LV: Ventriculo Lateral.

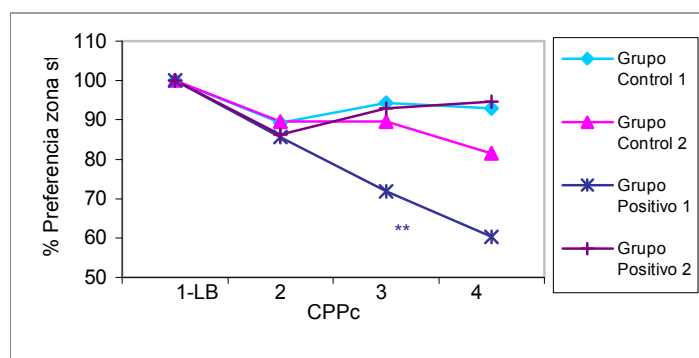
## RESULTADOS.

### **FASE 1.** *Condicionamiento concurrente de preferencia por un lugar (CPPc) en el laberinto con forma de corredor (Modelo 1).*

Siguiendo el criterio conductual pre-establecido para la distribución de los animales en los distintos grupos (Capítulo I de esta Tesis Doctoral), se formaron dos grupos de animales implantados, uno “positivo” constituido por 16 animales cuyo tiempo medio de permanencia en la zona asociada a la estimulación fue de 419.53 s y un grupo “neutral” formado por 12 animales con implante cuya estancia media en la zona asociada a la estimulación fue de 239.5 s. Por último, el tiempo de permanencia media en la zona del laberinto asociada a la estimulación del grupo de animales “controles intactos” (9 animales) fue de 239 s.

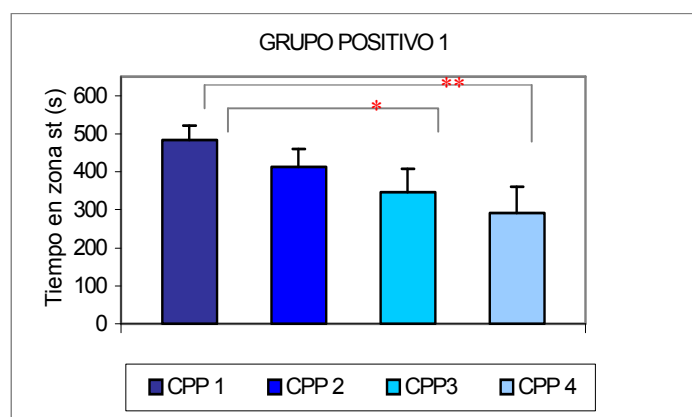
### **FASES 2 Y 3.** *Establecimiento de la línea base (CPPc) y estimulación eléctrica repetida de la Corteza Insular Agranular.*

Como se ha descrito anteriormente, en la segunda fase de este estudio los animales del grupo “positivo” fueron distribuidos de forma aleatoria en dos grupos (“Positivo 1” y “Positivo 2”), al igual que los animales de los grupos controles intacto e implantado, formando así los grupos “Control 1” y “Control 2”. Una vez establecidos los grupos, se analizaron los resultados obtenidos en las sesiones de CPPc que se llevaron a cabo en siguientes fases de este estudio (ver la siguiente gráfica).



**Figura 72.** Representación gráfica del porcentaje del tiempo de permanencia con respecto a la Línea Base (1-LB) mostrado por los distintos grupos de animales, en la zona del laberinto Modelo 1 asociada a la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular, según el ensayo de condicionamiento concurrente de preferencias por un lugar (CPPc). Los asteriscos muestran las diferencias significativas con una  $p < 0.01$  (\*\*).

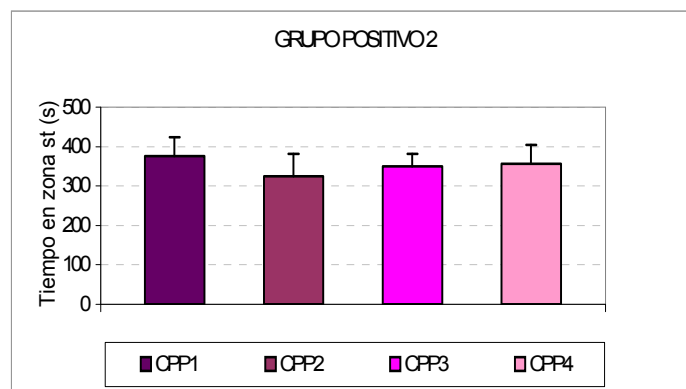
Para el análisis de los resultados obtenidos durante las 4 sesiones de CPPc (Fases 2 y 3), en cada uno de los grupos, se utilizó un análisis de varianza univariado intra-sujeto. Los resultados obtenidos en el **Grupo “Positivo 1”** muestran que, existe un efecto significativo del factor día de CPPc ( $F_{(3,21)} = 5.42$ ;  $p < 0.0064$ ), resultado que se representa en la siguiente gráfica (Figura 73), en la que se puede comprobar que, a medida que aumenta el número de ensayos de adquisición, disminuye el tiempo de permanencia de los animales en la zona del laberinto asociada a la estimulación eléctrica de la CI. El análisis post hoc (Newman-Keuls) de este efecto demuestra que existen diferencias significativas entre el día de línea base (CPP1) y el tercer ( $p = 0.0343$ ) y cuarto día de CPP ( $p = 0.0054$ ); no observándose estas diferencias el segundo día de condicionamiento (CPP 2,  $p = 0.1815$ ).



**Figura 73.** Representación gráfica del tiempo de permanencia (expresado en segundos) mostrado por los animales del grupo “Positivo 1”, en la zona preferida del laberinto con forma de corredor (Modelo 1) asociada a la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular. Los asteriscos muestran las diferencias significativas con una  $p < 0.05$  (\*) y  $p < 0.01$  (\*\*).

Por su parte, los resultados obtenidos en el **Grupo “Positivo 2”**, muestran que no hay efecto principal del factor día de CPPc ( $F_{(3,21)} = 0.2259$ ;  $p < 0.87$ ) (ver Figura 74).

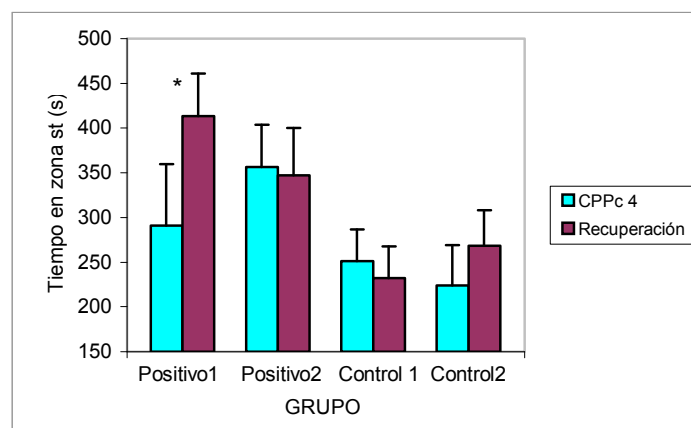
Resultados similares se han producido en los grupos controles, en los que no hay diferencias entre los ensayos de CPP en el **Grupo “Control 1”** ( $F_{(3,27)} = 0.0936$ ;  $p < 0.962$ ) ni en el **Grupo “Control 2”** ( $F_{(3,30)} = 0.4225$ ;  $p < 0.738$ ) (ver Figura 72).



**Figura 74.** Representación gráfica del tiempo de permanencia (expresado en segundos) mostrado por los animales del grupo “Positivo 2”, en la zona preferida del laberinto con forma de corredor (Modelo 1) asociada a la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular.

**FASE 4. Recuperación del efecto de preferencia por un lugar mediante el incremento de la intensidad de la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular.**

Por último, en la siguiente gráfica (Figura 75), se representan los resultados obtenidos por los distintos grupos, en el cuarto ensayo de CPPc y la prueba de recuperación (fase 4).



**Figura 75.** Representación gráfica del tiempo de permanencia (expresado en segundos) mostrado por los distintos grupos de animales, en la zona preferida del laberinto con forma de corredor (Modelo 1) asociada a la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular, durante el ensayo de condicionamiento concurrente de preferencias por un lugar (CPPc 4) y en la prueba de recuperación del refuerzo. Los asteriscos muestran las diferencias significativas con una  $p < 0.05$  (\*).



Tras llevar a cabo un análisis de varianza intra-sujeto de estos resultados, se puede comprobar que en el **Grupo “Positivo 1”**, existen diferencias significativas entre el ensayo CPPc 4 y el ensayo de Recuperación ( $F_{(1,7)} = 11.44$ ;  $p < 0.012$ ).

Este no es el caso del **Grupo “Positivo 2”**, en el cual el ANOVA intra-sujeto muestra que no hay diferencias significativas ( $F_{(1,7)} = 0.0857$ ;  $p < 0.7782$ ). Tampoco se obtienen diferencias significativas en el **Grupo “Control 1”** ( $F_{(1,9)} = 0.127$ ;  $p < 0.7294$ ) ni en el **Grupo “Control 2”** ( $F_{(1,10)} = 0.4499$ ;  $p < 0.5176$ ) (ver Figura 75).

## **DISCUSIÓN.**

Los resultados obtenidos en este experimento demuestran una vez mas que, la estimulación eléctrica de la CI Posterior induce preferencias por el lugar con el que es asociada. Sin embargo este efecto reforzante puede verse modificado en el caso de que la estimulación eléctrica sea repetida:

Así la activación **diaria** (durante 10 minutos) de la Corteza Insular Agranular provoca una reducción en el efecto reforzante de la estimulación, que se manifiesta por un descenso en el tiempo de permanencia de los animales en el lugar asociado a la estimulación.

Sin embargo, cuando la activación de esta región cortical se produce concurrentemente **en días alternos**, el efecto reforzante inducido por la estimulación permanece intacto, y los animales (Grupo “Positivo 2”) siguen manifestando una marcada preferencia por el lugar asociado a la estimulación.

Esta pérdida progresiva del efecto de la estimulación no parece deberse a alteraciones en la propia estimulación eléctrica (por ejemplo, modificación en la posición del electrodo) o a lesiones en el tejido cerebral, etc., ya que este efecto no se produce en el Grupo “Positivo 2” y sobre todo porque en la última fase de este estudio, al aumentar la intensidad de la corriente eléctrica administrada, los animales vuelven a mostrar preferencia por el lugar asociado a la activación eléctrica de la CI.

Por otra parte, este efecto de reducción de la acción reforzante de la estimulación eléctrica de la CI parece peculiar ya que no se produce en el caso de la autoestimulación eléctrica intracerebral (Bozarth, 1994). De hecho, una de las características más llamativas de la AEIC es el elevado índice de respuestas instrumentales que emiten los animales a lo largo de las sesiones sin que se produzca habituación o un descenso en su capacidad reforzante. Este hecho, junto a la ausencia de conductas de autoestimulación eléctrica inducida por la estimulación de la CI Posterior obtenidas en los experimentos anteriores de esta Tesis Doctoral y en otras investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio (Cubero y Puerto, 2000), sugieren que el efecto reforzante obtenido mediante la estimulación de la CI podría tener unas características diferentes de las propias del fenómeno de AEIC.

Alternativamente estos resultados sugieren, que la estimulación repetida de la Corteza Insular podría provocar un efecto similar al fenómeno de tolerancia observado tras la administración reiterada de algunas sustancias de abuso (Lieblich et al., 1991; Di Chiara y North, 1992; Mao, 1999; van Ree et al., 1999; Mitchell et al., 2000; Narita et al., 2001; Shippenberg et al., 2001; Taylor y Fleming, 2001; Vetulani, 2001; Bodnar y Hadjimarkou, 2003; Gerrits et al., 2003; Koob y Le Moal, 2006). En este sentido los resultados obtenidos en el presente experimento muestran que, al igual que ocurre con estas sustancias, una vez desarrollado este proceso, un incremento en la intensidad de la activación, permite recuperar el efecto reforzante inicial.

El fenómeno conductual de la tolerancia y la aparición de los síntomas de dependencia ocurren, al menos en parte, como resultado de las neuro-adaptaciones compensatorias que se producen durante la administración repetida y continua de las drogas. En respuesta a la estimulación provocada por las sustancias de abuso, se producen cambios y adaptaciones estructurales en el sistema nervioso que permiten mantener el equilibrio homeostático, al tiempo que reducen los efectos de estas sustancias (tolerancia) (Koob et al., 1993; Sim et al., 1996; Sklair-Tavron et al., 1996; Bernstein y Welch, 1998; Everitt et al., 2001; Kreek, 2001; Shippenberg et al., 2001; Taylor y Fleming, 2001; Weiss et al., 2001; Fernández-Espejo, 2002; Bodnar y Hadjimarkou, 2003; Bonci et al., 2003; Koob y Le Moal, 2006). Así, por ejemplo, a través del modelo de tolerancia en ratones, se ha comprobado que la administración crónica de morfina provoca un descenso en el número de receptores opiáceos  $\mu$  Tronco-encefálicos, efecto que no se produce tras la administración aguda de esta sustancia ni tampoco en animales controles a los que se les administra un placebo (Bernstein y Welch, 1998). Asimismo, mediante técnicas de

neuroimagen se ha demostrado que, en los sujetos con dependencia a los opiáceos se produce un descenso en la densidad de la materia gris del CórteX Prefrontal, Temporal e Insular (Lyoo et al., 2006).

Estos cambios o neuro-adaptaciones estructurales dan lugar a la aparición de respuestas fisiológicas que pueden condicionarse a distintos estímulos, de manera que la mera presencia de éstos provoque la aparición de las respuestas compensatorias, normalmente opuestas a los efectos inducidos por la droga (Lieblich et al., 1991; Siegel, 1999; Mitchell et al., 2000; Siegel et al., 2000; Vetulani, 2001; Siegel y Ramos, 2002). Algunos de los estímulos relacionados con las manifestaciones de tolerancia son los índices contextuales (Poulos y Cappell, 1991; Siegel et al., 2000; Vetulani, 2001; Schroeder y Kelley, 2002; Siegel y Ramos, 2002). Así, estudios llevados a cabo en seres humanos y en animales de laboratorio, han demostrado que el desarrollo de la tolerancia al efecto analgésico inducido por la morfina (Mitchell et al., 2000; Siegel et al., 2000; Siegel y Ramos, 2002), o al efecto anoréxico de la anfetaminas, o al efecto anticonvulsivante y la hipotermia inducida por el etanol (para una revisión ver Poulos y Cappell, 1991; Vetulani, 2001), es dependiente en gran medida del contexto, de manera que un simple cambio del entorno puede ser suficiente para eliminar la tolerancia. En el presente experimento la estimulación repetida (a diario) de la Corteza Insular en presencia de los mismos índices contextuales, podría haber facilitado también el descenso en la preferencia por un lugar mostrada por los animales.

La Corteza Insular puede desempeñar un papel destacado con respecto a la asociación que se produce entre las claves contextuales y los efectos inducidos por reforzadores tanto naturales como artificiales (Schroeder et al., 2001; Schroeder y Kelley, 2002; Volkow et al., 2006). Así, Schroeder y Kelley, han demostrado que la presencia de las claves contextuales asociadas al efecto de sustancias como la morfina o la nicotina, es suficiente para provocar activación (c-Fos) en distintas regiones cerebrales entre las que se encuentra el Sistema Límbico, el CórteX Prefrontal y la Corteza Insular Agranular. Esta activación neural está condicionada a la presencia del contexto específico en el cual fueron administradas las drogas de abuso, de manera que cuando se utiliza un contexto alternativo, ya no se produce la mencionada activación (Schroeder et al., 2001; Schroeder y Kelley, 2002). Estos autores comprobaron también, que existe una gran similitud entre estas áreas y las estructuras que se activan ante la presencia de estímulos condicionados a un reforzador natural como es el chocolate (Schroeder et al., 2001).

En resumen, los resultados obtenidos en este experimento, permiten proponer que la estimulación eléctrica de la CI Agranular ha podido activar una región cerebral implicada en procesos de recompensa peculiares (diferentes de AEIC), así como en el establecimiento de asociaciones entre el refuerzo y los estímulos presentes durante su adquisición. Asimismo en este estudio se demuestra que este efecto reforzante es susceptible a la tolerancia y a una posterior recuperación al incrementar la intensidad de la estimulación, características que se asemejan a las descritas para la acción de las sustancias de abuso.



**DISCUSIÓN  
FINAL**

---



## **DISCUSIÓN FINAL.**

El objetivo de esta Tesis Doctoral ha consistido en analizar la implicación funcional del eje Parabraquial-Cortical, representado por dos estructuras cerebrales situadas una a nivel Tronco Encefálico (el Núcleo Parabraquial Lateral Externo), y otra a nivel cortical (la Corteza Insular Posterior Agranular), en distintos modelos de aprendizaje. Estas dos áreas cerebrales, además de mantener interconexiones anatómicas entre sí (Fulwiler y Saper, 1984; Halsell, 1992; De Lacalle y Saper, 2000; Jasmin et al., 2004), han sido consideradas como centros de procesamiento claves en distintos procesos de regulación homeostática. Ambas reciben información masiva de tipo sensorial y visceral, tanto de índole aversivo como apetitivo (Fulwiler y Saper, 1984; Cechetto y Saper, 1987; Yamamoto et al., 1989; Herbert et al., 1990; Jia et al., 1994; Krukoff et al., 1994; Herbert y Bellintani-Guardia, 1995; Saper, 1995b; King et al., 1999; Augustine, 1996; De Lacalle y Saper, 2000; Krukoff y Loewi, 2000; Zhang y Oppenheimer, 2000; Sowards, 2004...), por lo cual se ha considerado que podrían desempeñar también un papel fundamental en determinados procesos de tipo asociativo.

Una de las técnicas clásicas empleadas para el análisis funcional de las distintas estructuras cerebrales es la estimulación eléctrica intracerebral, un procedimiento adecuado para la activación de los distintos sistemas biológicos y que, por ejemplo, ha sido utilizado en los procesos de aprendizaje, en lugar del estímulo condicionado o del incondicionado en el caso del condicionamiento clásico (Thompson, 1988), o también, entre otros, como índice biológico para facilitar el aprendizaje en diversos modelos de condicionamiento operante (Capdevila-Ortis et al., 1988; Gallo et al., 1988). Así ha sido en esta Tesis Doctoral, con el fin de examinar la significación funcional del NPLe y de la CI Posterior en determinados procesos asociativos, activando estas estructuras cuando los animales eran sometidos sobre todo a dos tareas de aprendizaje: el condicionamiento de preferencias por un lugar (CPP) o aprendizajes gustativos discriminativos.



Los resultados descritos en el **primer Capítulo** de esta Tesis Doctoral han reproducido que la estimulación eléctrica del NPBl induce consistentemente tres tipos de comportamientos en los animales cuando son sometidos a tareas de condicionamiento concurrente de preferencias por un lugar (CPPc): Por una parte, un número variable de animales manifiestan preferencias por los estímulos o índices (somatosensoriales, visuales o espaciales) asociados con la activación de esta estructura. Otros animales, por su parte, manifiestan una consistente aversión o evitación del lugar que ha sido asociado con la estimulación eléctrica del NPBl. Por último, también suele generarse un tercer conjunto de animales que no muestra una consistente preferencia o aversión por los distintos estímulos del entorno /espaciales asociados a la estimulación (denominados animales “neutros”).

Numerosos estudios han demostrado la existencia en el NPBl de una elevada cantidad de receptores opiáceos  $\mu$  y  $\kappa$  (Lynch, 1986; Mansour et al., 1988; 1994; 1995) así como terminales inmunorreactivas a péptidos opiáceos endógenos como las encefalinas o las endomorfina 1 y 2 (Maley y Panteón, 1988; Hermanson y Blomqvist, 1997; Chamberlin et al., 1999; Engström et al., 2001; Chen et al., 2004). Más aún la estimulación química diferencial de los receptores  $\mu$  y  $\kappa$  del Complejo Parabraquial Lateral puede provocar preferencias o aversiones en función de los sistemas opiáceos activados (Moufid-Bellancourt et al., 1996).

En este contexto, el primer experimento de esta serie demuestra que la administración de naloxona, no bloquea el efecto de preferencia inducido tras la activación de del NPBl, concretamente en los casos en los que se utiliza el mismo laberinto/ contexto en el que originalmente se estableció el aprendizaje y en el cual los animales retienen las experiencias previas. Por el contrario, el pretratamiento con el antagonista opiáceo logra impedir la adquisición de las preferencias por un lugar cuando la prueba se lleva a cabo en un nuevo contexto, con un laberinto nuevo y con una orientación espacial diferente, y en el que ahora ya no resulta útil la experiencia anterior.

Estos resultados no parecen deberse a un efecto inespecífico del fármaco que de alguna manera pueda originar algún déficit inespecífico en el establecimiento del aprendizaje asociativo, ya que los datos correspondientes al grupo “negativo” muestran que estos animales pueden desarrollar aversión hacia un lugar bajo la administración de naloxona.

Igualmente parece poco probable que un potencial efecto aversivo o motor provocado por la naloxona pueda haber influido en los resultados, ya que una vez más la administración de esta sustancia no afecta al comportamiento de los grupos “negativo” o “neutro”. Los datos obtenidos demuestran, por otra parte, que la naloxona, no sólo bloquea el efecto reforzante de la estimulación sino que también genera un estado motivacional negativo en estos animales que, a nivel conductual se refleja en una conducta de evitación o aversión hacia la zona asociada a la estimulación. Resultados similares a los descritos se han obtenido también por otros autores tras la administración de dosis bajas de naloxona en animales pre-tratados con opiáceos (McDonald et al., 1997; Blokhina et al., 2000; Parker et al., 2002).

El efecto reforzante obtenido a través de la estimulación eléctrica del NPBl plantea la posibilidad de que la estimulación eléctrica haya podido activar alguna de las estructuras relacionadas con el sistema general de refuerzo el cual sustenta, por ejemplo, las conductas de autoestimulación cerebral. En este sentido se ha comprobado que la AEIC del Hipotálamo Lateral induce la activación de un buen número de estructuras que incluyen el Prosencéfalo, el Diencefalo e incluso áreas del Tronco Cerebral todavía sin especificar con precisión como el NPB (Arvanitogiannis et al., 1997; Flores et al., 1997; Hunt y McGregor, 1998), o también las regiones ventrales del Pedúnculo Cerebeloso Superior, y concretamente las situadas en el tercio medio de la subdivisión medial de este núcleo (Ferssiwi et al., 1987; Arvanitogiannis, et al., 1997). Sin embargo, en el caso del NPBl, los intentos para inducir AEIC han resultado siempre infructuosos tras los experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio (Simón, 2003; Capítulos I y II de esta Tesis Doctoral). Aunque esta posibilidad no ha sido descartada, los datos sucesivos obtenidos en esta Tesis no excluyen otras hipótesis.

El examen de los efectos recompensantes de la morfina, sugiere que el Complejo Parabraquial Lateral podría no estar implicado en este proceso, ya que utilizando distintas tareas de aprendizaje (gustativo y espacial) la administración intra-Parabraquial de esta sustancia opiácea no induce preferencias (Bechara et al., 1993; Jaeger y Van der Kooy, 1996). Este resultado negativo contrasta con los datos obtenidos en este primer experimento y podría depender de factores de índole procedimental y particularmente de las características temporales de la tarea que se han utilizado. Distintos estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio (Zafra et al., 2002) así como los resultados obtenidos en el Capítulo II de esta Tesis Doctoral, demuestran que el NPBl solo sería esencial en aquellas modalidades de aprendizaje en las que existe contigüidad temporal inter-estimular. De

hecho, los datos obtenidos en el Experimento 1 de esta Tesis Doctoral, indican que la capacidad reforzante de la estimulación eléctrica del NPBe para inducir preferencias por un lugar requieren un procedimiento concurrente y podría estar mediada por los opiáceos endógenos ya que su efecto es bloqueado por la naloxona.

La posibilidad de que la naloxona haya podido bloquear el efecto reforzante inducido por la estimulación eléctrica del NPBe, se ve apoyada por estudios llevados a cabo con drogas de abuso como la morfina o la heroína (McFarland y Ettenberg, 1998; Mueller y Steward, 2000; Mueller et al., 2002). Así, McFarland y Ettenberg (1998) demostraron que, un grupo de animales recorría más rápidamente un laberinto en presencia de un estímulo distintivo que predecía la administración de heroína, que ante un estímulo que indicaba la administración de suero fisiológico. Inicialmente, la administración de naloxona, no afectaba al tiempo que estos animales tardaban en recorrer el laberinto ante la presencia del estímulo que predecía la heroína. Sin embargo, en una prueba posterior a este primer ensayo de tratamiento con naloxona, estos mismos animales ahora recorrían el laberinto mas lentamente en presencia del estímulo asociado a la heroína, empleando un tiempo significativamente mayor que el que utilizaban en presencia del estímulo asociado a la administración de suero fisiológico. En otras palabras y según estos autores, la naloxona podría haber afectado al refuerzo inducido por la administración de la heroína pero no a la motivación de los animales por conseguir la droga.

Por otra parte la estimulación del NPBe ha podido activar una estructura implicada en la atribución de incentivo, provocando un cambio en el valor hedónico inicial del estímulo asociado y haciendo que éste resulte más atractivo para el sujeto, y hacia el cual manifieste su preferencia. De hecho, el NPBe ha sido implicado en procesos de índole hedónico-afectivo (Bernard et al., 1991, 1994; 1995; Bester et al., 1995; 1997; Saper, 1995; Jasmin et al., 1997; Craig y Dostrovsky, 1999; Söderpalm y Berridge, 2000; Sowards, 2004). Y así, la administración intra-Parabraquial de benzodiazepinas, induce un aumento en la ingesta a través de un incremento en el valor hedónico que el sujeto hace del estímulo gustativo (Söderpalm y Berridge, 2000). Igualmente, el bloqueo de los receptores opiáceos de la región NPB ventro-lateral, se eliminan las preferencias de los sujetos hacia productos apetitosos (Edwards y Ritter, 1989; Moufid-Bellancourt et al., 1996), mientras que la restricción crónica de comida modifica la actividad de los receptores  $\mu$  y  $\kappa$  localizados en el NPBe y en el NPBme (Wolinsky et al., 1996; Carr et al., 1998).

La relación entre el refuerzo y la atribución de incentivo es controvertida. Para algunos autores podría depender de sustratos neurobiológicos distintos y con actuación independiente (Nader et al., 1996). Aunque, estos sistemas pueden activarse de forma simultánea al entrar en contacto con los estímulos reforzantes (por ejemplo las drogas de abuso) o por los estímulos asociados a éstos, la conducta de aproximación hacia estos últimos, podría depender de procesos independientes del sistema de refuerzo, implícitos y no conscientes. Así, los efectos discriminativos de la morfina que actúan dirigiendo la conducta en una tarea de aprendizaje asociativo víscero-gustativo, podían ser activados en el NPBl sin producir ningún efecto motivacional reforzante (Jaeger y Van der Kooy, 1993; 1996; Nader et al., 1996).

Otros autores por el contrario, consideran que, si bien estos dos procesos están mediados por sustratos anatómicos distintos, estarían estrechamente interrelacionados (Berridge y Robinson, 1998). En este sentido, y en contra de lo planteado por Nader y colaboradores, autores como Berridge y su grupo (1998), consideran que el proceso de atribución de incentivo mediante el cual un determinado estímulo adquiere la propiedad de dirigir la conducta, requiere un aprendizaje asociativo de tipo explícito (Berridge y Robinson, 1998; Ikemoto y Panksepp, 1999), de forma que el animal sea capaz de transferir dicho aprendizaje a un nuevo contexto, en el cual existan unas condiciones distintas a las presentes durante la adquisición del condicionamiento (Reber et al., 1996; Eichenbaum, 2002).

Por otra parte, existe un cierto consenso entre los científicos con respecto al hecho de que el sustrato biológico implicado en el refuerzo, puede ser compartido con los sistemas motivacionales que procesan los reforzadores naturales (Wise y Rompré, 1989; White y Milner, 1992; Wise, 1996). Así, investigaciones llevadas a cabo con técnicas inmuno-histoquímicas han demostrado la activación del NPBl tras administración de nutrientes tales como la glucosa, lactosa o sacarosa (Wang et al., 1999; Yamamoto y Sawa, 2000a) o de productos apetitivos (Yamamoto et al., 1994; Yamamoto y Sawa, 2000b), todos ellos con efectos recompensantes de carácter motivacional (reducción del estado de déficit) o hedónicos (estímulos con una alta palatabilidad) (Le Magnen, 1990; Carr, 1996; Nencini, 1996). Y al revés, lesiones específicas del NPBl o generales del Complejo Parabraquial, que incluyen el subnúcleo Lateral Externo, bloquean las preferencias por sustancias nutritivas, como la sacarosa (Reilly y Trifunovic, 2000a), la comida apetitosa o hacia estímulos gustativos asociados a la administración de nutrientes reforzantes (Zafra et al., 2002).

Existe la posibilidad por tanto, de que los efectos obtenidos en nuestro estudio hayan sido debidos a que la estimulación eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo, habría podido activar un sistema visceral provocando consecuencias viscerales positivas o negativas, similares a las observadas ante un estímulo visceral natural, y además que pueden ser asociadas a una determinada zona espacial, originando así preferencias o aversiones hacia un lugar, según los casos. En este sentido, se ha demostrado que se pueden inducir preferencias por un lugar si la ingesta de agua o la infusión intragástrica de sacarosa o agua, se produce inmediatamente antes de confinar a los animales en un compartimiento específico de un laberinto en T (Arnold y Agmo, 1999). Asimismo, investigaciones previas de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que la estimulación eléctrica intracerebral de distintas estructuras puede inducir preferencias o aversiones hacia los estímulos con los que ha sido asociada, ya sean de tipo gustativo (Gallo et al., 1988; Agüero et al., 1993b; Cubero y Puerto, 2000, Simón, 2003) o espacial (Simón, 2003; Hurtado et al. 2006).

En otras palabras, este efecto podría ser similar al observado cuando un estímulo gustativo se asocia a beneficios metabólicos o a la administración intragástrica de alimentos, y elicitaba la preferencia gustativa por dicho estímulo (Puerto et al., 1976a, b; Puerto y Molina, 1977; Le Magnen, 1990; Zafra et al., 2002), particularmente en un núcleo como el NPBe que constituye uno de los primeros relevos centrales en el procesamiento de las señales víscero-gustativas (Fulwiler y Saper, 1984; Herman y Rogers, 1985; Lança y Van der Kooy, 1985; Herbert et al., 1990; Moga et al., 1990; Papas y Ferguson, 1990; Bernard et al., 1991; 1993; Halsell, 1992; Kobashi et al., 1993; Krukoff et al., 1993; 1994; Light et al., 1993; Saleh y Cechetto, 1993; Alden et al., 1994; Jia, et al., 1994; Slugg y Light, 1994; Saper, 1995b; De Lacalle y Saper, 2000; Krout y Loewi, 2000).

La hipótesis anterior también podría ser aplicable en el caso del efecto aversivo evocado en algunos animales por la estimulación eléctrica y que se manifiesta a través de la conducta de evitación de la zona asociada con la estimulación. Es posible que la estimulación intracerebral del NPBe pueda activar células que codifican la información visceral negativa (por ejemplo relacionada con el dolor visceral) (Yamamoto et al., 1994; Millan, 2002), originando una sensación de malestar similar a la observada tras la administración de un agente tóxico (Mediavilla et al., 2000) o incluso por algún estímulo doloroso, ya que el NPBe ha sido relacionado con el procesamiento de información nociceptiva (Bernard et al., 1991; 1994; 1995; Besson et al., 1994; Wang et al., 1994; Bester et al., 1997; Jasmin et al., 1997; Engström et al., 2001).

También existe un buen número de pruebas que relacionan al Complejo Parabraquial con el establecimiento del aprendizaje aversivo gustativo (Agüero y Puerto, 1986; Di Lorenzo, 1988; Spector et al., 1992; Agüero et al., 1993a, b; 1997; Bielavska y Bures, 1994; Swank y Bernstein, 1994; Scalera et al., 1995; Nader et al., 1996; Sakai y Yamamoto, 1997; 1998; Shimura et al., 1997; Reilly, 1999; Bielavska et al., 2000; Cubero y Puerto, 2000b; Mediavilla et al., 2000; 2001a, b; Reilly y Trifunovic, 2000b; Cubero et al., 2001). Así por ejemplo, mientras que las lesiones del NPBl interrumpen la adquisición de este tipo de condicionamiento (Mediavilla et al., 2000a), lesiones en el extremo dorsolateral del PB (que incluyen el NPBl), bloquean el condicionamiento espacial aversivo inducido por la administración periférica de la morfina (Bechara et al., 1993). Igualmente, Sakai y Yamamoto (1997) han demostrado que la administración de una gran variedad de productos aversivos y reforzantes para establecer este aprendizaje, provocan la activación del NPBl.

De acuerdo con este planteamiento existe la posibilidad de que los resultados obtenidos en el grupo “negativo” de este estudio y, en el que la naloxona reduce (no significativamente) el efecto aversivo de la estimulación, podría depender de su acción sobre estos sistemas opiáceos, mientras que, los resultados obtenidos en el grupo “neutro” podrían hipotéticamente deberse a una activación simultánea de ambos tipos de receptores opiáceos ( $\mu$  y  $\kappa$ ) (Spanagel et al., 1992; Bals-Kubick et al., 1993; Pan, 1998; Narita et al., 2001).

En particular este efecto aversivo de los opiáceos tiene un cierto carácter paradójico, ya que dosis parecidas de morfina pueden actuar como estímulo adecuado en una tarea de aprendizaje aversivo gustativo o inducir preferencias en un paradigma de aprendizaje de preferencia por un lugar (Mucha y Herz, 1985), y todo ello dependiendo del mecanismo neurobiológico implicado (periférico o central) así como del tipo de receptor sobre el que actúen (Mucha y Herz, 1985; Bechara y van der Kooy, 1985; 1987; Bechara et al., 1993; Moufid-Bellancourt y Velley, 1994; Moufid-Bellancourt et al., 1996; van Ree et al., 1999; van Ree et al., 2000).

Más aún, por ejemplo, la administración de morfina intra-Parabraquial modifica las preferencias gustativas hacia una solución dulce (sacarina) mostradas por los animales, convirtiéndolas en aversión (Moufid-Bellancourt y Velley, 1994; Moufid-Bellancourt et al., 1996), efecto que al parecer es debido a su actuación predominante sobre los receptores de opiáceos  $\kappa$  (Bechara y van der Kooy, 1985; 1987).



utilizaron tareas de discriminación gustativa, en las que la estimulación eléctrica del NPBlc era asociada a uno de los estímulos gustativos (ofrecido siempre en la misma posición). En el primero de estos estudios (experimento 2) se introdujo un intervalo de demora de 15 minutos entre la ingesta del estímulo gustativo y la activación eléctrica del NPBlc (modalidad de aprendizaje a largo plazo o secuencial), mientras que en el experimento 3, la ingesta del estímulo gustativo era seguida de la estimulación intracerebral en contigüidad temporal (característica de los aprendizajes implícitos).

Los resultados obtenidos sugieren que las variantes temporales impuestas en estas tareas de aprendizaje discriminativo pueden desempeñar un papel fundamental en la inducción de las preferencias y/o aversiones inducidas mediante estimulación eléctrica del NPBlc. Así, en la modalidad de aprendizaje demorado, la estimulación eléctrica del NPBlc no logra inducir preferencias ni aversiones gustativas, a pesar del incremento (duplicado) en el número de ensayos de aprendizaje. Este resultado es compatible con investigaciones previas en las que se ha demostrado que, lesiones que incluyen a este mismo subnúcleo, no interrumpen el aprendizaje aversivo gustativo de tipo secuencial inducido por la administración intragástrica de cloruro de litio (Nader et al., 1996).

Este no es el caso cuando se llevaron a cabo tareas de aprendizaje concurrentes, en las que los animales desarrollan conductas de preferencia y/o evitación, según los casos, hacia los estímulos del entorno con los que es asociada.

Más aún, cuando el procedimiento experimental es no demorado/ en contigüidad (Experimento 3), la estimulación intracerebral genera de nuevo preferencias por el estímulo gustativo asociado a la activación eléctrica del NPBlc (Experimento 3A), o una reducción en la ingesta del sabor asociado a la estimulación en el grupo de animales “negativos” (Experimento 3B); unos resultados compatibles con los obtenidos al inicio del experimento en la tarea de condicionamiento de preferencia por un lugar de tipo concurrente.

Estos resultados también son compatibles teóricamente con otros estudios que muestran una activación del NPBlc tras la estimulación eléctrica de las ramas aferentes del nervio Vago (Saleh y Cechetto, 1993; Gieroba y Blessing, 1994), o tras la administración de sustancias que estimulan los receptores viscerales periféricos permitiendo así una detección visceral rápida de los distintos productos (Yamamoto et al., 1992; Hochstenbach et al., 1993; Kobashi et al., 1993; Hayward y Felder, 1995; Sakai y Yamamoto, 1997; Wang et al., 1999; Yamamoto y Sawa, 2000a, b; Karimnamazi et al., 2002). Estos



componentes neurobiológicos son esenciales en la inducción de preferencias gustativas a través de la administración intragástrica de nutrientes predigeridos en pruebas experimentales concurrentes/ a corto plazo; un efecto que es bloqueado al lesionar el NPBl (Zafra et al., 2002).

La relevancia que el intervalo de tiempo inter-estimular puede desempeñar en la inducción de conductas de preferencia había quedado reflejada en un estudio llevado a cabo por Arnould y Agmo (1999), en el cual la infusión intragástrica de glucosa, puede inducir preferencias hacia los índices del entorno con los que es asociada, en una tarea de condicionamiento de preferencia por un lugar en contigüidad, pero no sucede así si se introduce una demora temporal entre los estímulos de 15 minutos (Arnould y Agmo, 1999).

Pero además esta región Parabraquial ha sido implicada en la modalidad concurrente del aprendizaje aversivo gustativo. Así, los datos obtenidos en este capítulo, también son compatibles con estudios llevados a cabo por Mediavilla y colaboradores (2000), en los que se ha demostrado que la administración intragástrica de cloruro sódico hipertónico (sustancia detectable por vía vagal) puede ser asociada de forma concurrente a la ingesta de un estímulo gustativo, provocando una reducción en la ingesta de dicho estímulo (aprendizaje interoceptivo), y que este efecto puede ser bloqueado mediante lesiones del NPBl (Mediavilla et al., 2000). Resultados similares se han observado tras la administración i.p. de morfina, donde de nuevo amplias lesiones del Complejo Parabraquial Lateral interrumpen el aprendizaje, hecho que no sucede cuando la zona lesionada es el NPB Medial o también cuando se utiliza como estímulo visceral el cloruro de litio, una sustancia que es procesada prioritariamente por vía sanguínea (Bechara et al., 1993; Nader et al., 1996).

Por tanto, de acuerdo con las investigaciones previas y los datos presentados en este capítulo, el NPBl parece participar en la modalidad de aprendizaje en contigüidad exclusivamente. Existe la posibilidad, sin embargo, de que los animales hayan aprendido y almacenado de alguna manera la información, a través de un mecanismo explícito que les permitiría transferir los conocimientos adquiridos a nuevas situaciones estimulares. Para comprobar esta hipótesis, tras el Test de Discriminación Gustativa, se llevó a cabo un Test de Inversión en el que se invertía la posición estimular (izquierda-derecha) que se había utilizado durante la adquisición del aprendizaje (Reber et al., 1996). Los resultados obtenidos muestran que los animales no logran transferir el aprendizaje adquirido previamente. Las modificaciones contextuales introducidas con respecto a las que se

llevaron a cabo durante el aprendizaje, son decisivas y los animales no logran transferir los conocimientos adquiridos. Estos resultados sugieren que el NPBl solo formaría parte del circuito anatómico implicado en el procesamiento de la información de tipo implícito.

Existe la posibilidad, sin embargo, de que los animales hayan aprendido utilizando índices espaciales o propioceptivos, lo cual significaría que en el Test de Inversión no se habrían producido modificaciones con respecto a la situación de aprendizaje. En ese caso, cabría esperar que los animales mostraran la respuesta conductual aprendida, a saber, aumentar la ingesta del estímulo gustativo localizado en la posición que previamente había sido asociada a la estimulación eléctrica del NPBl. Aunque se produce una tendencia en esa dirección, esta posibilidad deberá ser examinada en mayor detalle en próximos experimentos.

En resumen, de acuerdo con los resultados del presente estudio se puede concluir que la participación del NPBl en la inducción de preferencias gustativas estaría en función de los requisitos temporales de la tarea. Es decir que, en el caso de modalidades de aprendizaje flexibles que incluyan, por ejemplo, importantes demoras inter-estimulares la relevancia de este subnúcleo pontino parece ser nula. La ausencia de flexibilidad es característica de las estructuras cerebrales implicadas en la adquisición de conocimientos implícitos (Petri y Mishkin, 1994; Reber et al., 1996).



Anatómicamente relacionado con el Complejo Parabraquial, se encuentra el Córtex Insular (Fulwiler y Saper, 1984; Halsell, 1992; De Lacalle y Saper, 2000). Los resultados obtenidos en el **Capítulo III** de esta Tesis Doctoral demuestran a través de la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Posterior Agranular (en una tarea de aprendizaje de preferencias por un lugar de tipo concurrente), que estaría implicada en los procesos motivacionales de recompensa cerebral, induciendo respuestas de aproximación/preferencia, o de evitación/aversión hacia los índices somatosensoriales, ambientales o visuales con la que es asociada. Se ha demostrado asimismo que este comportamiento mostrado por los animales es consistente tanto en lo referente a la aversión/evitación como en la preferencia hacia los estímulos ambientales asociados a la estimulación eléctrica intracerebral.

Este efecto de consistencia ha sido examinado a través de tareas de CPPc, en las que se utilizaron dos laberintos diferentes que además fueron orientados de distinta manera, de forma que quedaran modificados los índices estímulares tanto internos como externos del entorno. En este contexto, los resultados obtenidos han demostrado que los efectos inducidos por la estimulación eléctrica del Córtex Insular no son aleatorios, y que la inducción de preferencias en algunos de los animales y la evitación de la zona asociada a la estimulación en otros, es un efecto consistente.

Estos efectos de preferencia contrastan con la incapacidad mostrada por los animales para autoinducirse estimulación eléctrica intracerebral, lo cual sugiere que las preferencias por un lugar inducidas por la estimulación eléctrica de la CI Posterior pueden no ser debidas a la activación del circuito general de refuerzo. Estudios llevados a cabo por McGregor y Atrens (1991), demuestran que los animales pueden inducirse autoestimulación eléctrica intracerebral activando zonas adyacentes a la CI más anterior, de hecho, en áreas muy próximas a la región estimulada en nuestro estudio. Sin embargo, no ha sido este el caso en investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio, cuando la zona estimulada era la propia CI Posterior (Cubero y Puerto, 2000), a pesar de las preferencias mostradas hacia los estímulos gustativos asociados. En este sentido, se ha comprobado que ciertas sustancias, como el cannabis, el ácido lisérgico dietilamida (LSD), la buspirona o el pentilentetrazol, también inducen preferencias por los estímulos ambientales asociados a su administración, sin que tampoco se haya logrado comportamientos de autoadministración (Bardo y Bevins, 2000; Tanda y Goldberg, 2003).

Es posible que el CPP y la autoadministración (ya sea mediante estimulación eléctrica, AEIC, o a través de la administración de sustancias) impliquen dos modalidades distintas de refuerzo. En efecto, investigaciones recientes han puesto de manifiesto que, por ejemplo, la capacidad de ciertas drogas (Bardo y Bevins, 2000) o la estimulación eléctrica de diversas estructuras (Garris et al., 1999) para activar el sistema dopaminérgico mesolímbico, es dependiente de que la sustancia o la estimulación sea administrada por el experimentador o esté bajo el control operante del animal, de modo que sólo en el último caso se produce un aumento en la liberación de dopamina en el Núcleo Accumbens (Garris et al., 1999; Bardo y Bevins, 2000). También a través de algunos estudios farmacológicos se han disociado estos dos procesos de modo que, mientras la administración de antagonistas dopaminérgicos D<sub>2</sub> no afecta al condicionamiento de preferencia por un lugar inducido por la administración de cocaína (Cervo y Samanin, 1995; Baker et al., 1996),

estos fármacos son efectivos cuando se trata de la conducta de autoadministración de la misma sustancia (Corrigall y Coen, 1991; Caine y Koob, 1994).

En cualquier caso, las preferencias o aversiones hacia un lugar inducidas por la estimulación eléctrica de la CI, sugieren que la información gustativa, visceral y nociceptiva (Cechetto y Saper, 1987; Yamamoto et al., 1989; Kinomura et al., 1994; Augustine, 1996; McDonald, 1998; Francis et al., 1999; Gautier et al., 1999; King et al., 1999; Small et al., 1999; Peyron et al., 2000; Treede et al., 2000; Zhang y Openheimer, 2000; Swards y Swards, 2002; Dupont et al., 2003; Swards, 2004...), que este área cortical procesa, pudiera estar relacionada con los estados de recompensa o aversión que se producen. Unos estados que, por otra parte, podrían ser asociados a estímulos somatosensoriales (la textura del suelo), visuales (las paredes de las distintas zonas de los laberintos), o espaciales, originando conductas de aproximación o evitación hacia estos estímulos.

En este sentido, diversos estudios anatómicos, neurofisiológicos y conductuales han demostrado la participación de la CI en el procesamiento de la información somatosensorial, tanto inocua como nociceptiva (Augustine, 1996; Chikama et al., 1997; Hanamori et al., 1998; Ito, 1998; McDonald, 1998; Zhang et al., 1999; Peyron et al., 2000; Treede et al., 2000; Zhang y Openheimer, 2000; Ogawa y Wang; 2002; Peyron et al., 2002; Swards y Swards, 2002; Wise et al., 2002; Cobos et al., 2003; Dupont et al., 2003; Inui et al., 2003...). También se ha implicado la Corteza Insular Posterior en tareas de aprendizaje espacial (Bermúdez-Rattoni et al., 1991; Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991; Nerad et al., 1996). Concretamente, Nerad y colaboradores (1996) han comprobado que lesiones de la Corteza Insular Posterior en ratas, bloquean el aprendizaje en una tarea de localización espacial, cosa que no sucede cuando la lesión se localiza en la región anterior.

Por otra parte, existe abundante evidencia de que la Corteza Insular Posterior participa en el procesamiento de la información gustativa. Así, mediante técnicas neurofisiológicas se ha demostrado la existencia de neuronas que responden al sabor en la Ínsula Agranular (Hanamori et al., 1998; King et al., 1999; Ogawa y Wang, 2002), aunque entremezcladas con otras células mecano y termo-receptivas (Norgen, 1995). De hecho, algunos autores consideran que esta región podría actuar modulando el procesamiento de la información gustativa que se produce principalmente en la CI Anterior (Ogawa y Wang, 2002). Concretamente, Swards y Swards han propuesto que, mientras la Corteza Insular Anterior podría estar implicada en el procesamiento de la información sensorial de los

estímulos, tanto gustativos como somatosensoriales, la representación hedónica estaría localizada en la CI Posterior (Sewards y Sowards, 2001; 2002; Sowards; 2004), en la cual parece producirse una convergencia de la información sensorial y visceral (Hanamori et al., 1998; Ogawa y Wang, 2002).

De acuerdo con lo descrito anteriormente, podría proponerse que la estimulación de la Corteza Insular Posterior podría haber activado alguno de los componentes neurales implicados en el proceso de recompensa, provocando así una clara preferencia por los estímulos gustativos o somatosensoriales con los que ha sido asociada. Este aprendizaje resultaría adaptativo para los animales puesto que les permitiría aproximarse o evitar determinados estímulos, con independencia de sus cualidades sensoriales.

En cualquier caso, estos estudios no permiten concretar, la acción fisiológica desencadenada por la estimulación del Córtex Insular Posterior para inducir preferencias o aversiones. Cabe la posibilidad de que la estimulación haya podido actuar como sustituto adecuado de algún estímulo visceral positivo o negativo, que permita el proceso asociativo establecido durante el condicionamiento de preferencia por un lugar. En investigaciones previas se ha comprobado que la estimulación eléctrica de estructuras como el Área Postrema, puede actuar como sustituto del estímulo visceral y/ o de sus consecuencias motivacionales, en un paradigma de aprendizaje aversivo gustativo (Gallo et al., 1988; Agüero et al., 1993b), generando en los animales respuestas de rechazo hacia los estímulos gustativos con los que fue asociada.

En efecto, la Corteza Insular ha sido implicada en el procesamiento de la información visceral (Cechetto y Saper, 1987; Yamamoto et al., 1989; Chikama et al., 1997; Hecht et al., 1999; King et al., 1999; De LaCalle y Saper, 2000; Zhang y Oppenheimer, 2000; Dupont et al., 2003; Gabbott et al, 2003; Vertes, 2004), de modo que por ejemplo, la activación eléctrica del nervio Vago a nivel cervical (Ito, 1998) o la estimulación del esófago (Hecht et al., 1999), provoca una activación de la CI, mientras que, al revés, la estimulación eléctrica de la CI provoca cambios en la amplitud de las contracciones y del tono gástrico (Aleksandrov et al., 1996).

De acuerdo con estos resultados, nuestros datos podrían explicarse en el sentido de que la estimulación de la CI Posterior, ha podido activar algún sistema neural implicado en el procesamiento de la información visceral positiva, el cual podría ser asociado con determinados lugares del espacio, originando así la preferencia hacia dicho lugar. De modo

análogo se ha comprobado que la asociación de un estímulo gustativo concreto con beneficios metabólicos concretos puede generar una preferencia hacia dicho estímulo gustativo (Puerto et al., 1976a, b; Puerto y Molina, 1977; Le Magnen, 1990).

Con respecto al grupo experimental “negativo”, en el que la estimulación eléctrica de la CI genera una tendencia a evitar zona asociada con la estimulación, es probable que la misma hipótesis propuesta anteriormente pueda ser aplicable. Así existe la posibilidad de que la estimulación eléctrica esté activando células que codifican información visceral negativa (por ejemplo, relacionada con el dolor visceral), originando de esta manera, sensaciones de malestar que harían que los animales prefieran el lugar asociado a la no estimulación. En este sentido, algunos datos disponibles relacionan a la Corteza Insular con el procesamiento de la información somatosensorial y sobre todo, nociceptiva (Augustine, 1996; Peyron et al., 2000; Treede et al., 2000; Zhang y Oppeheimer, 2000; Dupont et al., 2003).



De acuerdo con los sistemas neuroquímicos existentes en la Corteza Insular, este estudio se ha planteado si las preferencias por un lugar inducidas por la activación de esta región, pueden implicar la activación de sistemas de recompensa de índole opiácea (Mansour et al., 1994; García et al., 1995; Burkey et al., 1996; Burkey et al., 1999; Paredes et al., 2000).

Para comprobar esta hipótesis se llevó a cabo el experimento 5 (**Capítulo IV**) de esta Tesis Doctoral, en el que se analizó el efecto de un antagonista opiáceo, la naloxona, en el condicionamiento de preferencias por un lugar establecido mediante la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular Posterior. Los resultados obtenidos demuestran que la administración de naloxona bloquea el efecto reforzante de la estimulación eléctrica de la CI Posterior, impidiendo la adquisición de las preferencias por un lugar cuando éste se produce en un contexto (laberinto) nuevo, pero no cuando la naloxona se administra en el mismo laberinto en el que inicialmente se establecieron las preferencias. En este último caso, los animales siguen eligiendo las zonas del laberinto en las cuales desarrollaron inicialmente sus preferencias.

Los datos obtenidos en este experimento podrían ser explicados a partir del hecho de que la estimulación eléctrica de la CI Agranular Posterior ha podido activar vías/ núcleos de refuerzo o aversión mediadas por el sistema de opiáceos (Mansour et al., 1994; García et al., 1995; Svingos et al., 1995; Burkey et al. 1996; Burkey et al. 1999; Izenwasser et al., 1999; Allen et al., 2003). En este sentido, se ha demostrado la presencia de numerosas células en las áreas corticales insular y parietal, que son marcadas por anticuerpos (c-Fos, JunB) tras la administración aguda de morfina tanto sistémica como local. Este efecto puede ser bloqueado por la administración de naltrexona o naloxona (García et al., 1995; Burkey et al., 1996). Más aún, se ha comprobado que, la administración de naloxona puede provocar inmunorreactividad (c-Fos) en estructuras cerebrales tales como el Núcleo Central de la Amígdala, la división Lateral del Núcleo Lecho de la Estría Terminal, el Núcleo Paraventricular del Tálamo y particularmente en la propia la Corteza Insular (Allen et al., 2003).

Los resultados obtenidos tras la administración de naloxona en el grupo “**positivo**”, no parecen deberse a un déficit general en el proceso de adquisición y asociación entre los estímulos, puesto que en el grupo de animales “**negativo**” el aprendizaje no resulta afectado. Por otra parte, tampoco parece deberse a un efecto colateral aversivo o motor, inducido por esta sustancia, ya que en el grupo “**neutro**” o “**negativo**” no se observa ningún cambio conductual reseñable.

A nivel conductual, existen diversas investigaciones que han relacionado a la CI con distintos efectos de los opiáceos (Mackey et al., 1986; Zito et al., 1988; Burkey et al., 1996; 1999). Por ejemplo, Burkey y colaboradores (1996) demostraron la inducción de efectos analgésicos tras la administración de morfina en esta región, un efecto que era bloqueado mediante naltrexona (un antagonista  $\mu$  opiáceo). Este mismo estudio, pudo demostrar que la administración de morfina en la CI producía una reducción significativa en el número de neuronas reactivas (c-Fos) al dolor en la médula espinal dorso-lumbar, un efecto que de nuevo era bloqueado mediante la administración de naltrexona en la CI.

Otros estudios han demostrado también, la activación de la Corteza Insular en respuesta a los estímulos térmicos dolorosos, así como un descenso de dicha actividad tras la administración de agonistas de los receptores  $\mu$  opiáceos como el fentanilo o el remifentanilo (Casey et al., 2000; Wise et al., 2002). Este efecto, similar al obtenido en el Córtex Cingulado Anterior, es consistente con la presencia de receptores  $\mu$  opiáceos en estas estructuras (Jones et al., 1991, a; b). De acuerdo con estos datos, un estudio reciente

ha demostrado que la administración de remifentanilo provoca la activación (registrada mediante resonancia magnética funcional) de áreas con receptores  $\mu$  opiáceos como son la Amígdala, el Córtex Cingulado Anterior, el Córtex Prefrontal, la Corteza Parietal Posterior o la propia Corteza Insular (principalmente la porción postero-superior) (Leppä et al., 2006). En opinión de estos autores, es probable que la activación registrada pueda deberse, a la implicación de estas estructuras en un circuito neural que module la experiencia afectiva de los estímulos sensoriales (Leppä et al., 2006).

En esta misma línea podría citarse el estudio llevado a cabo por Duncan y colaboradores (1998), en el que estos autores pudieron inducir analgesia en pacientes con dolor neuropático crónico, mediante la estimulación eléctrica del Tálamo somatosensorial (Tálamo Ventroposterior Lateral y Medial)). Este tratamiento provocaba un aumento del flujo sanguíneo cerebral (registrado con Tomografía por emisión de Positrones) en la CI rostral ipsilateral al lugar de la estimulación.

De acuerdo con estos datos, existe la posibilidad de que los resultados obtenidos en el **grupo “positivo”** de nuestro estudio, puedan ser debidos a que la estimulación eléctrica de la CI Agranular Posterior ha podido activar los sistemas de opiáceos endógenos que, teóricamente podrían actuar sobre el mismo sustrato neural que utiliza la morfina para inducir diversos efectos positivos, por ejemplo analgésicos, recompensantes así como sus correspondientes estados de bienestar (van Ree et al., 1999; Paredes et al., 2000; van Ree et al., 2000; Bodnar y Hadjimarkou, 2003), unos efectos que pueden ser disociados (Wilson et al., 2000).

Efectos reforzantes mediados por los opiáceos de la CI, también se han logrado después de aplicar estimulación eléctrica convulsivante repetida (kindling) capaz de generar preferencias por un lugar; un efecto que puede ser bloqueado mediante la administración de naloxona (Paredes et al., 2000). Estos resultados son compatibles a los obtenidos en el presente experimento de esta Tesis Doctoral, aunque en nuestro caso ocurre en otra región cerebral (zona Agranular) y utilizando parámetros estimulares de rango fisiológico (muy lejos de originar descargas convulsivas), además de implicar procedimientos típicos de aprendizaje asociativo (Cubero y Puerto, 2000), en los cuales los estímulos externos son relacionados con la estimulación intracerebral recompensante (y no al revés como en el caso del estudio de Paredes y colaboradores).



Por otra parte, es probable que los resultados de aversión/ evitación obtenidos en el **grupo “negativo”** puedan ser explicados también a través de los sistemas opiáceos. Esta propuesta explicaría el hecho de que la administración de naloxona reduzca parcialmente el efecto aversivo observado en el grupo “negativo”, puesto que esta sustancia es un antagonista opiáceo no selectivo que produce un potente bloqueo del receptor  $\mu$  y un antagonismo moderado sobre los receptores  $\kappa$  y  $\delta$  (Pinazo, 1997). De hecho y con respecto a los receptores opiáceos  $\kappa$  (Burkey et al., 1996; Izenwasser et al., 1999), se ha comprobado que la administración de agonistas genera en seres humanos un efecto aversivo y acciones psicotomiméticas (Izenwasser et al., 1999), así como respuestas de aversión hacia un lugar y gustativas en ratas (Mucha y Herz, 1985; Herz y Spanagel, 1995; Shippenberg y Elmer, 1998).

Efectos análogos a la aversión hacia un lugar inducida por la administración de naloxona en el grupo “positivo” obtenida en la tercera fase de este experimento, se han encontrado en otros estudios utilizando morfina (McDonald et al., 1997; Blokhina et al., 2000; Parker et al., 2002). En estas investigaciones se ha demostrado que la administración de dosis bajas de naloxona en animales que previamente habían sido tratados con morfina (aunque sea en una única administración aguda), provoca un estado motivacional aversivo parecido al síndrome de abstinencia agudo a los opiáceos precipitado por naloxona, y que también es capaz de inducir aversiones condicionadas hacia distintos estímulos (gustativos y ambientales/ espaciales) (Hand et al., 1988; McDonald et al., 1997; Blokhina et al., 2000; Parker et al., 2002). También se ha demostrado que esta respuesta condicionada es “dependiente del estado”, es decir, solo se manifiesta cuando las condiciones en las que se reproduce son las mismas que las presentes durante la adquisición del condicionamiento (Bormann y Overton, 1996). Por tanto, aunque el síndrome de retirada a los opiáceos es una experiencia aversiva, las asociaciones establecidas por este evento aversivo, pueden afectar o no a la conducta futura en función de los estímulos asociados al estado inducido por la droga y que deberían estar presentes en el momento del aprendizaje (McDonald et al., 1997).

En otro orden de cosas, conviene analizar la problemática del contexto en el aprendizaje, una cuestión que también se ha puesto de manifiesto en este experimento. Los resultados obtenidos en la Fase 2 de esta investigación demuestran que si se utiliza el mismo contexto en el que se adquirieron las preferencias por un lugar, la administración de naloxona no bloquea el comportamiento de preferencia. Al parecer, una vez que los animales han aprendido que en un determinado espacio se produce un estado afectivo

positivo, lo vuelven a elegir aunque ahora no obtengan el refuerzo correspondiente. De un modo similar, estudios llevados a cabo con sustancias de abuso como la morfina, heroína o cocaína, demuestran que los animales mantenían la respuesta conductual de aproximación o retirada ante estímulos asociados a la administración de la droga, incluso durante largos periodos de tiempo (hasta 12 semanas), y ello en ausencia de la droga (Contarino et al., 1999; Mueller y Steward, 2000; Mueller et al., 2002; Shi et al., 2003). En otras palabras, los estímulos contextuales asociados a las drogas de abuso, siguen promoviendo y dirigiendo la conducta hacia la búsqueda y consecución de la droga, incluso en las situaciones en las que no se obtienen sus efectos reforzantes (McFarland y Ettenberg 1998; Mueller y Steward, 2000; Mueller et al., 2002). Es probable que las claves espaciales hayan adquirido propiedades de incentivo especialmente atractivas o “salientes” para los animales, que son difíciles de eliminar a pesar del paso del tiempo (Mueller y Steward, 2000). En el caso de que el condicionamiento espacial sea extinguido, es suficiente la administración de una única dosis de morfina (priming), para reinstaurar la “saliencia” de incentivo de las claves contextuales recuperando de nuevo la preferencia por un lugar (Mueller y Steward, 2000; Mueller et al., 2002; Robinson y Berridge, 2003).

La disociación entre el impacto hedónico que un estímulo puede provocar y la atribución de saliencia o de incentivo es controvertida. El hecho de que determinados estímulos externos inicialmente neutros puedan convertirse, tras ser asociados a consecuencias positivas, en estímulos especialmente atractivos hasta el punto de que motive al sujeto para conseguirlos, estaría en la línea teórica de autores, como Berridge y colaboradores (Berridge y Robinson, 1998). Para estos investigadores los circuitos neurales implicados en estos dos procesos están fuertemente interrelacionados aunque no sean los mismos (Berridge y Robinson, 1998). Consideran que existen distintos sistemas de neurotransmisión para cada uno de estos procesos, y concretamente relacionan al sistema de opiáceos con el impacto hedónico de un estímulo mientras que la dopamina, sería el sustrato del sistema de atribución de incentivo (Treit y Berridge, 1990; Agmo et al., 1995; Berridge y Robinson, 1998; McFarland y Ettenberg, 1998; 1999; Peciña y Berridge, 2000; Kelley y Berridge, 2002).

De acuerdo con la propuesta teórica de estos autores, está por determinar si en el presente experimento la estimulación eléctrica ha podido llevar a cabo una nueva atribución de incentivo, provocando un cambio en la valoración que el animal hace de los estímulos y todo ello provocado por el importante impacto hedónico de la estimulación recompensante, la cual finalmente conduce a manifestaciones de aproximación o preferencia por un lugar.

En cualquier caso, investigaciones recientes han demostrado que la CI desempeña un papel fundamental en el procesamiento de la información afectiva o emocionalmente “saliente” (Kiefer y Orr, 1992; DeCouteau et al., 1997; Balleine y Dickinson, 1998; Schoenbaum et al., 1998; Gallagher et al., 1999; Ragozzino y Kesner, 1999; O’Doherty et al., 2003; Pizzagalli et al., 2003; Small et al., 2003; Wright et al., 2003; Phan et al., 2004), por ejemplo durante la expresión facial o verbal de miedo (Shin et al., 2000; Wright et al., 2003), de disgusto (Phillips et al., 1997), o al recordar situaciones que generan ansiedad (Liotti et al., 2000) o tristeza (Lane et al., 1997), e incluso, a la hora de hacer valoraciones hedónicas innatas o aprendidas de los estímulos gustativos (Yamamoto et al., 1989; Kiefer y Orr, 1992; Phillips et al., 1997; Yamamoto et al., 1998; Cubero y Puerto, 2000). Con respecto al último caso, Kiefer y Orr (1992) demostraron a través de tareas de aprendizaje aversivo gustativo, que los animales lesionados en la CI podían desarrollar aprendizajes de evitación conductual aunque, no mostraban (mediante el Test de reactividad orofacial de Norgren) los cambios en el valor hedónico del estímulo gustativo (de positivo a negativo) propio de este tipo de aprendizaje. Del mismo modo, un buen número de estudios ha propuesto que la CI podría ser esencial a la hora de establecer el valor recompensante de los alimentos (DeCouteau et al., 1997; Balleine y Dickinson, 1998, 2000; Beninger y Miller, 1998; Ragozzino y Kesner, 1999), y así, tras su lesión se produce un importante deterioro en el recuerdo de la magnitud del valor reforzante de la comida. Como consecuencia de ello, los animales no adoptan conductas apropiadas para compensar la devaluación de la recompensa (DeCouteau et al., 1997; Balleine y Dickinson, 1998, 2000; Ragozzino y Kesner, 1999).

Estas modalidades de procesos adquisitivos parecen ir más allá de una mera representación de mecanismos asociativos o de una simple correlación entre dos eventos, o en otras palabras, de que la presencia de un estímulo suponga la aparición de un evento reforzante, con el cual ha sido previamente asociado. Se ha propuesto que el aprendizaje de incentivo, implicaría la adquisición de una representación cognitiva de la recompensa o del estímulo reforzante y su relación con distintas alternativas de respuesta, estableciendo así un conocimiento explícito de la relación entre la conducta y sus consecuencias y permitiendo que el sujeto pueda hacer inferencias sobre eventos que aún no han ocurrido (Balleine y Dickinson, 1998). En este contexto se considera que el sistema de neurotransmisión implicado en la adquisición de esta capacidad predictiva o de anticipación ante estímulos aversivos o apetitivos, sería el sistema dopaminérgico mesolímbico (Accumbens), el cual estaría implicado en facilitar respuestas de aproximación ‘flexibles’ ante la presencia de estímulos atractivos o ‘salientes’ (Ikemoto y Panksepp, 1999).



notables cambios en la estrategia de respuesta para adaptar la conducta humana a las modificaciones introducidas en las demandas de la tarea (Huettel y McCarthy, 2004).

Igualmente, estudios conductuales llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado que la estimulación eléctrica del Córtex Insular Posterior induce una clara preferencia por los estímulos gustativos novedosos con los que ha sido asociada, en una tarea de aprendizaje gustativo de tipo secuencial demorado (Cubero y Puerto, 2000) mientras que las lesiones de esta región no impiden la adquisición del aprendizaje aversivo gustativo concurrente (Cubero, 1995). En este sentido, otras investigaciones realizadas por nuestro Grupo de Investigación han demostrado que solo aquellos animales que aprenden mediante un procedimiento demorado (o a largo plazo), pueden transferir ese aprendizaje a nuevas situaciones en las que han cambiado las condiciones experimentales, es decir en un Test de Inversión, mostrando así una manifestación conductual de adquisición flexible (Petri y Mishkin, 1994; Reber et al., 1996; Mediavilla et al., 2001; Eichenbaum, 2002). Por el contrario, los animales en los que el procedimiento de adquisición es concurrente son incapaces de realizar correctamente el Test de Inversión, sin discriminar entre los dos estímulos gustativos y alternando entre ellos (Mediavilla et al., 2001a).

Sin embargo, los resultados negativos obtenidos en el Test de Inversión del presente estudio, sugieren que el aprendizaje de preferencias establecido es poco flexible. Estos resultados podrían explicarse en función de que el aprendizaje obtenido fue débil y también de acuerdo con el procedimiento experimental utilizado para establecer el aprendizaje. En este último sentido, Mishkin y colaboradores han propuesto que “lo que se aprende depende de cómo se aprende” es decir que si la información ha sido procesada y adquirida siguiendo un aprendizaje asociativo implícito, el acceso posterior a dicha información, dependería de la presencia de unas condiciones similares a las establecidas durante el aprendizaje (Petri y Mishkin, 1994). De acuerdo con esto, los resultados obtenidos en el Test de Inversión son los que cabría esperar. Por el contrario, si el procedimiento experimental utilizado permite a los animales la adquisición de una representación cognitiva del estímulo reforzante y su relación con las distintas alternativas de respuesta, estableciendo así un conocimiento explícito de la relación entre la conducta y sus consecuencias, esta modalidad adquisitiva permitirá una mayor flexibilidad al sujeto para transferir el conocimiento a nuevas situaciones estímulares, permitiéndole así hacer inferencias sobre eventos futuros (Petri y Mishkin, 1994).

Inicialmente también debe tenerse en cuenta que en este experimento concreto, el aprendizaje de preferencias establecido resultó débil y por ello es posible que los animales hayan tenido una mayor dificultad para transferirlo a las nuevas contingencias experimentales. Sin embargo, al intentar potenciar este aprendizaje, aumentando el número de ensayos de condicionamiento (dos sesiones más), se obtuvo una disminución en las preferencias establecidas. Curiosamente, estos resultados no se producen, por ejemplo, en las tareas instrumentales de refuerzo mediante autoestimulación intracerebral, en las cuales, los animales mantienen su capacidad de autoestimulación a lo largo del tiempo (horas, días), sin que se produzca una reducción en la respuesta (Miliaressis et al., 1986; Bozarth, 1994).

El hecho de que los animales se encuentren en un estado de privación de refuerzo (o abstinencia) provocado por la ausencia de la estimulación eléctrica y ello después de la activación repetida de esta estructura, puede ser determinante. En este sentido y en ausencia de morfina, se ha comprobado que la abstinencia provocada (por el efecto de tolerancia que se produce) tras la administración repetida de esta droga de abuso, puede provocar un descenso en la ingesta así como en la preferencia mostrada por una solución apetitosa con la que es asociada (Lieblisch et al., 1991).

En la Fase 3 de este experimento, se ha examinado la posible presencia de algunas de las manifestaciones comportamentales características de la abstinencia espontánea provocada por la ausencia de estimulación reforzante. Específicamente, el análisis se ha centrado en los cambios observados en la conducta exploratoria de los animales, a través de dos índices: la respuesta locomotora horizontal (contabilizando el número de cruces que realiza el animal al pasar de una zona a otra del laberinto) (Balcells-Olivero y Vecina, 1997; Bell et al., 1997; Hamamura et al., 1997; Tzschentke y Schmidt, 1999; Chefer et al., 2000; Bradley y Meisel, 2001; Viganò et al., 2003); y la respuesta locomotora vertical o número de respuestas de alzada/ "rearings" (Balcells-Olivero y Vecina, 1997; Hamamura et al., 1997; Tzschentke y Schmidt, 1999; Chefer et al., 2000; Roitman et al., 2002; Viganò et al., 2003).

Los resultados obtenidos muestran un aumento significativo en la actividad exploratoria de los animales tratados con estimulación eléctrica reforzante. Este incremento en la actividad se manifiesta concretamente, en la actividad locomotora vertical /o "rearings" pero sin afectar a la actividad locomotora horizontal (número de cruces que se producen al pasar de una zona a otra del laberinto).

Como se señalaba más arriba, estas dos conductas exploratorias (actividad horizontal y vertical) han sido consideradas como respuestas relacionadas con la administración de sustancias de abuso. Sin embargo, estas manifestaciones comportamentales han sido disociadas en función de los efectos que los fármacos opiáceos ejercen sobre ellas. Así, investigaciones llevadas a cabo mediante la administración de anfetaminas, sustancias cuya administración provoca un aumento en la respuesta locomotora horizontal y vertical, demuestran que la administración de naltrexona (antagonista opiáceo), bloquea exclusivamente el incremento en el número de respuestas de alzada /“rearings” sin afectar a la respuesta horizontal de locomoción (Balcells-Olivero y Vecina, 1997). Este hecho sugiere que las respuestas de alzada/ “rearings” provocados por la administración de anfetaminas están mediados por mecanismos opiáceos (Balcells-Olivero y Vecina, 1997). Estos resultados sugieren, en nuestro caso, una posible implicación opiácea en los datos obtenidos mediante la estimulación eléctrica de la Corteza Insular.

Sin embargo, los resultados de nuestro experimento también pueden ser explicados en términos de *sensibilización conductual*. Distintas investigaciones han demostrado que la administración discontinua de sustancias de abuso como los opiáceos, la cocaína o las anfetaminas puede provocar un aumento en la sensibilidad hacia los efectos de la droga, y que pueden manifestarse en forma de activación locomotora o alteraciones en el refuerzo (Hamamura et al., 1997; Pierce y Kalivas, 1997; Mao, 1999; Tzschentke y Schmidt, 1999; Chefer et al., 2000; Wyvell y Berridge, 2001; Drouin et al., 2002; Everitt y Wolf, 2002; Fernández-Espejo, 2002; Avena y Hoebel, 2003; Viganò et al., 2003; Yoo et al., 2003; Robinson y Kolb, 2004; Koob y Le Moal, 2006). Se ha propuesto que estos efectos serían el reflejo de cambios estructurales y morfológicos que la administración intermitente de las drogas provocan en el Sistema Nervioso Central, y más concretamente, en los sistemas cerebrales relacionados con la recompensa (Pierce y Kalivas, 1997; Robinson y Kolb, 1997, 1999; Berridge y Robinson, 1998; Berke y Hyman, 2000; Robinson y Berridge, 2000; Everitt et al., 2001; Hyman y Malenka, 2001; Shippenberg et al., 2001; Everitt y Wolf, 2002; Fernández-Espejo, 2002; Robinson et al., 2002; Bonci et al., 2003; Robinson y Berridge, 2003).

Igualmente, investigaciones recientes han puesto de manifiesto cómo algunos estados motivacionales que eliciten las conductas propias del repertorio conductual natural de los animales (la conducta sexual, conductas por déficit de sodio o la propia privación de comida), pueden provocar también una sensibilización neuronal en las vías dopaminérgicas

mesolímbicas (Bradley y Meisel, 2001), o cambios morfológicos en la neuronas del NAcc similares a las observadas tras la administración de drogas psicoactivas como las anfetaminas (Roitman et al., 2002). A nivel conductual, este efecto neurobiológico se ve reflejado en un aumento (o sensibilización de la respuesta) tanto de la conducta motivada natural (aumento de la respuesta sexual) (Bradley y Meisel, 2001) como de la respuesta locomotora provocada por la administración de estimulantes psicomotores como las anfetaminas o la cocaína (tolerancia cruzada) (Bell et al., 1997; Bradley y Meisel, 2001; Roitman et al., 2002).

De acuerdo con estos resultados, es probable que la estimulación eléctrica de la CI haya podido actuar sobre sistemas opiáceos endógenos, de modo que la activación repetida (de forma intermitente) de esta estructura podría haber inducido una sensibilización en el circuito cerebral implicado en la recompensa, resultando de todo ello, un aumento en la conducta locomotora de estos animales. Este efecto suele verse incrementado cuando los animales son situados en presencia de claves contextuales que previamente habían estado asociadas a la activación de esta estructura, de modo que ahora la expresión conductual del proceso de sensibilización puede ser modulada por procesos de aprendizaje asociativo (Anagnostaras y Robinson, 1996; Berke y Hyman, 2000; Robinson y Berridge, 2003; Robinson y Kolb, 2004).

Por último, y como se menciona anteriormente, el síndrome de abstinencia también puede ser provocado cuando los animales o los humanos tratados con opiáceos reciben la administración de un antagonista opiáceo (Mucha et al., 1982; McDonald et al., 1997; Tzschentke, 1998; Stinus et al., 2000; Lowe et al., 2002; Parker et al., 2002). Esta modalidad de inducción ha sido denominada *abstinencia precipitada* (Parker et al., 2002), y constituye un procedimiento útil para provocar y analizar experimentalmente no sólo los signos somáticos propios de la abstinencia (como diarrea, rinorrea, rechinar de los dientes, temblores, pérdida de peso, etc), sino también las propiedades motivacionales aversivas que de ésta se derivan (como cambios en la conducta exploratoria, tendencia a conductas de escape, aumento en el número de “rearings” o actividad locomotora vertical, posturas anormales y sacudidas del lomo) (Mucha et al., 1982; Mucha, 1987; Hand et al., 1988; Koob et al., 1993; McDonald et al., 1997; Kreek y Koob, 1998; Liu et al., 1999; Tzschentke y Schmidt, 1999; Berke y Hyman, 2000; Stinus et al., 2000; Gracy et al., 2001; Hamlin et al., 2001; Narita et al., 2001; Parker et al., 2002; Sinchaisuk et al., 2002; Le Guen et al., 2003; Zhou et al., 2003).



Los resultados obtenidos en la última fase de este experimento muestran que la administración de naloxona, en animales que habían sido expuestos de forma repetida a la estimulación eléctrica de la CI Agranular Posterior, provoca un estado motivacional aversivo capaz de inducir evitación o aversión hacia las claves espaciales que previamente habían sido preferidas y con las que ahora había sido asociada. Estos resultados son muy similares a los observados en distintas investigaciones en las que, el síndrome de abstinencia es precipitado en ratas dependientes de la morfina, generando sistemáticamente un estado motivacional aversivo que provoca la evitación o aversión hacia los estímulos, ya sean gustativos o espaciales, con los que había sido asociada (Hand et al., 1988; McDonald et al., 1997; Stinus et al., 2000; Gracy et al., 2001; Parker et al., 2002). Igualmente mediante técnicas de neuro-imagen (resonancia magnética funcional) y c-fos se ha demostrado la implicación de la CI en la abstinencia opiácea “precipitada”. Así, la administración de naloxona en ratas pretratadas con morfina provoca a nivel conductual, los síntomas propios del síndrome de abstinencia a los opiáceos, mientras que a nivel neural genera la activación de distintas estructuras entre las que se encuentra la Corteza Insular, además de otras (Erdtmann-Vourliotis et al., 1998; Georges et al., 2000; Lowe et al., 2002).

En esta línea, algunos estudios farmacológicos han llegado a la conclusión de que la dopamina puede desempeñar un papel fundamental en el desarrollo del síndrome de abstinencia (Bechara et al., 1998; Tzschentke, 2001; De Vries y Shippenberg, 2002; Devoto et al., 2002; Fernández-Espejo, 2002). Así, por ejemplo, durante el síndrome agudo de abstinencia se ha detectado un aumento en los niveles de dopamina de la Corteza Prefrontal junto con un marcado descenso en la liberación de este neurotransmisor en el Núcleo Accumbens (Tzschentke, 2001; Devoto et al., 2002; Fernández-Espejo, 2002). Estas alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica han sido relacionadas directamente con los síntomas de disforia emocional y anhedonia observados durante la abstinencia (Nestler, 2001; De Vries y Shippenberg, 2002; Fernández-Espejo, 2002). Aunque, como se ha mencionado anteriormente, los síntomas somáticos y conductuales son característicos de la abstinencia opiácea, ambos pueden ser disociados (Mucha, 1987; Stinus et al., 1990; Bechara et al., 1995). Así, la administración de antagonistas dopaminérgicos en animales dependientes de la morfina puede provocar los signos somáticos característicos del síndrome de abstinencia, al tiempo que elimina los síntomas afectivos/ motivacionales aversivos derivados de la abstinencia opiácea (Bechara et al., 1998; Laviolette et al., 2002).

En otros estudios llevados a cabo por estos y otros autores se sugiere que, el sustrato neuroanatómico que sustenta los efectos motivacionales aversivos inducidos por el

síndrome de abstinencia en ratas adictas y los provocados por la administración aguda de morfina, podría ser el mismo (Bechara et al., 1993; Nader et al., 1996; Bechara et al., 1998; De Vries y Shippenberg, 2002). De acuerdo con los resultados aportados la información de las propiedades aversivas derivadas de la administración aguda de morfina sería transmitida a través del nervio Vago (Bechara y van der Kooy, 1985; 1987) hacia regiones no determinadas del Complejo Parabraquial Lateral (Bechara et al., 1993) y posteriormente, mediante vías aferentes dopaminérgicas meso-corticales, a la región Insular Agranular (Mackey et al., 1986; Zito et al., 1988). En este sentido se ha demostrado que, las lesiones bilaterales del Complejo Parabraquial Lateral o de la Corteza Insular Agranular, eliminan la adquisición de las aversiones gustativas inducidas por la administración de morfina pero no las provocadas por el cloruro de litio (Mackey et al., 1986; Zito et al., 1988; Bechara et al., 1993).

Todos estos datos, y también los resultados obtenidos en este experimento, apoyarían que los efectos motivacionales aversivos provocados por la administración de opiáceos y los inducidos por el síndrome de abstinencia en ratas adictas podrían utilizar un sustrato neurobiológico específico (Bechara et al., 1993; Nader et al., 1996; Bechara et al., 1998; De Vries y Shippenberg, 2002), en el cual la Corteza Insular Agranular parece desempeñar un papel final fundamental.

En conclusión, los resultados obtenidos en este capítulo muestran que la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular induce un efecto reforzante en distintas tareas de aprendizaje (gustativa y espacial). Sin embargo, este efecto puede reducirse tras la estimulación repetida de esta área cortical y que se refleja comportamentalmente en un aumento en la actividad vertical/ “rearings” de los animales, característico de la sensibilización y/ o del síndrome de abstinencia opiácea. Asimismo, la administración de un antagonista opiáceo (naloxona) a este mismo grupo de animales (abstinencia precipitada), genera un estado motivacional aversivo que se manifiesta por un rechazo o aversión hacia el lugar con el que previamente había sido asociado la estimulación. Estos resultados podrían estar relacionados y son compatibles, con el efecto y las consecuencias derivadas de la administración de manera repetida de algunas sustancias de abuso.



En el séptimo y último experimento (**Capítulo VI**) de esta Tesis Doctoral, se procedió a la estimulación eléctrica repetida de la Corteza Insular Agranular Posterior en una tarea de CPPc. A fin de determinar la relevancia que el número de sesiones con estimulación puede ejercer sobre las preferencias por un lugar, uno de los grupos experimentales utilizados recibió el doble de ensayos de activación eléctrica que el otro.

Los resultados obtenidos muestran una vez mas que, la estimulación eléctrica de la Corteza Insular induce preferencias por un lugar aunque este efecto reforzante puede modificarse en función del número de ensayos con estimulación de la Corteza Insular. Concretamente, cuando la activación de esta región se lleva a cabo **diariamente**, se produce un descenso progresivo en el efecto reforzante de la estimulación, que se manifiesta a nivel conductual por el hecho de que los animales van reduciendo progresivamente el tiempo de permanencia en la zona estimulada. Por el contrario, cuando la estimulación de la Corteza Insular se lleva a cabo solo en **días alternos**, reduciendo por tanto el número de ensayos con estimulación, los animales siguen mostrando una consistente preferencia por el lugar estimulado.

Esta disminución en el efecto reforzante de la estimulación eléctrica no es irreversible puesto que, como se muestra en la última fase de este experimento, un incremento del 15 % en la intensidad de la corriente administrada, es suficiente para que los animales vuelvan a mostrar sus preferencias por el lugar estimulado.

Esta reducción en la eficacia de la estimulación eléctrica reforzante no se produce nunca en el caso de la autoestimulación eléctrica intracerebral, en la cual es habitual la persistencia por parte del animal para auto-administrarse la estimulación eléctrica reforzante sin que se observen cambios en su capacidad recompensante (no se observa un desplazamiento de la curva de ejecución del animal hacia la derecha) (Miliaressis et al., 1986; Wise y Rompré, 1989; Bozarth, 1994). Este hecho junto con la ausencia de conductas de autoestimulación intracerebral inducidas por la estimulación eléctrica de la CI Agranular Posterior obtenida en los experimentos 4 y 5 de esta Tesis Doctoral, y en otros estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio (Cubero y Puerto, 2000), sugiere que el efecto reforzante inducido mediante la activación de esta región posee unas características aparentemente diferentes a las propias de la activación de un circuito de refuerzo general que sustenta conductas de autoestimulación (McGregor y Atrens, 1991).

Sin embargo, los resultados obtenidos en este último experimento son compatibles y muy similares a los datos aportados por otras investigaciones en las que se ha mostrado que, la administración repetida de algunas sustancias de abuso como la morfina o los psicoestimulantes, puede provocar tolerancia en algunos de los efectos inducidos por estas sustancias, entre ellos la analgesia y /o refuerzo, o la dependencia física que se manifiesta a través de los síntomas típicos del síndrome de retirada (Lieblich et al., 1991; Bakshi y Kelley, 1994; Herz y Spanagel, 1995; Bell et al., 1997; Hamamura et al., 1997; Bernstein y Welch, 1998; Mao, 1999; van Ree et al., 1999; Mitchell et al., 2000; Drouin et al., 2002; Everitt et al., 2001; Narita et al., 2001; Taylor y Fleming, 2001; De Vries y Shippenberg, 2002; Avena y Hoebel, 2003; Bodnar y Hadjimarkou, 2003; Gerrits et al., 2003; Sun y Dalman, 2003; Viganò et al., 2003; Koob y Le Moal, 2006).

Estas manifestaciones conductuales resultantes de la exposición repetida a las drogas se deben una vez mas o al menos en parte, a los cambios morfológicos, estructurales y funcionales que se producen en distintas regiones cerebrales (principalmente límbicas y prefrontales) y que permiten mantener el equilibrio homeostático reduciendo así los efectos negativos generados por estas sustancias (tolerancia) (Koob et al., 1993; Sim et al., 1996; Sklair-Tavron et al., 1996; Bernstein y Welch, 1998; Robinson y Kolb, 1999a, b; Everitt et al., 2001; Kreek, 2001; Shippenberg et al., 2001; Taylor y Fleming, 2001; Weiss et al., 2001; Fernández-Espejo, 2002; Franklin et al., 2002; Bodnar y Hadjimarkou, 2003; Bonci et al., 2003; Spiga et al., 2003; Lyoo et al., 2006). Un proceso de neuro-adaptación biológica similar al descrito para las drogas de abuso podría explicar los resultados obtenidos en la última fase de este experimento, y en el que además se pudo comprobar que un aumento en la intensidad de la estimulación eléctrica administrada permite recuperar el efecto de preferencia por el lugar inicial.

También mediante técnicas de imagen cerebral y auto-radiográficas se ha podido comprobar un descenso en la concentración y en la densidad de la materia gris del Córtex Prefrontal, Temporal e Insular en pacientes dependientes de los opiáceos (Lyoo et al., 2006) o de la cocaína (Franklin et al., 2002). En éstas últimas personas, se produce también un incremento en la densidad del transportador de la serotonina en áreas como el Estriado, el Núcleo Accumbens, los giros Orbitofrontal y Cingulado, así como en la porción Anterior de la Corteza Insular (Mash et al., 2000).

Más aún, los resultados de investigaciones con animales también han demostrado que la exposición repetida a distintas sustancias de abuso como los psicoestimulantes

(cocaína, anfetaminas, nicotina) o los narcóticos como la morfina, provocan cambios morfológicos y estructurales en algunas regiones cerebrales tales como el ATV, Núcleo Accumbens, el Hipocampo, el Córtex Prefrontal, y la propia Corteza Insular Agranular (Sklair-Tavron et al., 1996; Robinson y Kolb, 1999a, b; Spiga et al., 2003). Algunas de estas modificaciones estructurales están relacionadas con el número de receptores, de modo que, por ejemplo, la administración repetida de morfina, da lugar a un descenso en el número de receptores opiáceos  $\mu$  Tronco-Encefálicos (Bernstein y Welch, 1998). Con respecto a otros cambios en la plasticidad neural, se ha demostrado que, en general, la exposición repetida a los psicoestimulantes provoca un incremento de las espinas dendríticas en el Núcleo Accumbens y el Córtex Prefrontal Medial (Robinson y Kolb, 1999a), mientras que en el caso de la morfina, se observa una disminución en la densidad de éstas en ambas regiones (Robinson y Kolb, 1999b). Dentro de la Corteza Insular Agranular también se han detectado cambios en la morfología dendrítica, aunque en este caso, en la dirección opuesta. Concretamente se ha comprobado que la auto-administración de anfetaminas por parte de los animales, provoca una disminución en la densidad de las espinas dendríticas de esta región, mientras la administración de morfina, genera un aumento en la densidad y en las arborizaciones dendríticas (para una revisión ver Robinson y Kolb, 2004). Así pues, se podría proponer que la estimulación repetida de la CI ha podido provocar efectos plásticos en de una de las regiones implicadas en el efecto reforzante que ejercen algunas sustancias de abuso así como en los efectos derivados de su consumo reiterado.

La gran abundancia de receptores opiáceos localizados en la Corteza Insular (Mansour et al., 1994; García et al., 1995; Svingos et al., 1995; Burkey et al. 1996; Burkey et al., 1999; Izenwasser et al., 1999; Allen et al., 2003) permite proponer que, el efecto reforzante de la estimulación eléctrica de la Corteza Insular, bloqueado por naloxona, así como el efecto de tolerancia, podría estar mediado por el sistema de opiáceos endógenos. Esta propuesta es compatible además con el hecho de que los animales de laboratorio desarrollen conductas de auto-administración de opiáceos endógenos y de que este sistema suela desempeñar un papel fundamental en las propiedades reforzantes así como en la capacidad de inducir dependencia que caracteriza a los opiáceos y a otras drogas de abuso (van Ree et al., 2000; Shippenberg et al, 2001; Gerrits, et al., 2003; von Zastrow y Evans, 2006).

Un factor crucial en el desarrollo de la tolerancia es el contexto (Poulos y Cappell, 1991; Siegel et al., 2000; Vetulani, 2001; Schroeder y Kelley, 2002; Siegel y Ramos,

2002). Numerosos estudios han demostrado que la tolerancia generada por diferentes sustancias de abuso como la morfina (Mitchell et al., 2000; Siegel et al., 2000; Siegel y Ramos, 2002), las anfetaminas o el etanol entre otros (para una revisión ver Poulos y Cappell, 1991; Vetulani, 2001), depende en gran medida del aprendizaje que se establece entre los estímulos presentes en el entorno o contexto y la administración de la droga, hasta tal punto que un cambio del entorno puede ser suficiente para eliminar la tolerancia. Sin embargo, este no ha sido el caso de los resultados obtenidos en el presente experimento, ya que la estimulación repetida de la Corteza Insular se produce siempre en presencia de las mismas claves contextuales, lo cual no impide un descenso en la preferencia por el lugar mostrada por los animales.

Por otra parte, se ha demostrado que la Corteza Insular podría desempeñar un papel importante en el proceso de asociación que se produce entre el contexto y los reforzadores, tanto naturales como artificiales (Schroeder et al., 2001; Schroeder y Kelley, 2002; Volkow et al., 2006). Así, algunos estudios han demostrado una activación de la Corteza Insular Agranular, junto a otras estructuras del sistema de recompensa cerebral, ante la presencia de claves o estímulos que anticipan una recompensa (Schoenbaum et al., 1998; Elliot et al., 2000; Kirsch et al., 2003). Es más, estas áreas junto con la CI Agranular parecen ser sensibles al valor de la recompensa (Gallagher et al., 1999; Elliot et al., 2000; Gottfried et al., 2003; Kirsch et al., 2003; O'Doherty et al., 2003). Concretamente, Kirsch y colaboradores (2003) han demostrado una mayor activación del sistema de recompensa cerebral y de la Ínsula ante la anticipación de una recompensa atractiva, por ejemplo monetaria, que en el caso de un refuerzo verbal positivo (Kirsch et al., 2003).

Además, otras investigaciones, han puesto de manifiesto que la presencia de claves contextuales relacionadas con la administración de drogas de abuso, en sujetos adictos a los opiáceos, la cocaína o el alcohol, puede desencadenar síntomas similares a los observados durante el síndrome de abstinencia propiamente dicho, así como un gran deseo o ansia (“cravings”) por consumir la droga (Childress et al., 1999; Cardinal et al., 2002). Una de las regiones cerebrales más implicadas en el desarrollo de este efecto es la Corteza Insular. En este sentido Schroeder y Kelley, comprobaron que la mera presencia de los índices contextuales asociados al efecto de sustancias como la morfina o la nicotina, provocan una actividad (c-Fos) en regiones cerebrales como el Sistema Límbico, el Córtex Prefrontal y la Corteza Insular Agranular (Schroeder et al., 2000; Schroeder et al., 2001; Schroeder y Kelley, 2002). Esta activación neural estaba asociada a la presencia del contexto específico donde se administraron las drogas, ya que en un contexto alternativo, no se producía la

mencionada activación (Schroeder et al., 2001; Schroeder y Kelley, 2002). Estos autores concluyen que existe una gran similitud entre estas áreas y las estructuras que se activan ante la presencia de estímulos condicionados a un reforzador natural como es el chocolate (Schroeder et al., 2001).

Más aún, estudios llevados a cabo en personas dependientes de sustancias de abuso como la heroína o la cocaína, han demostrado un aumento en el metabolismo de la CI cuando éstos mantenían una conversación relacionada con el consumo de la droga (Wang et al., 1999), cuando veían una película con elementos relacionados con su consumo (Garavan et al., 2000) o cuando informaban del “ansia/ necesidad por consumir” (craving) dichas sustancias (Wang et al., 1999; Garavan et al., 2000; Sell et al., 2000; Bonson et al., 2002; Kilts et al., 2004). En un estudio llevado a cabo por Wang y colaboradores (1999), se comprobó una activación asimétrica de la Corteza Insular según los requerimientos de la tarea planteada a los sujetos. Así, se demostró que cuando los sujetos mantenían una conversación relacionada con el consumo de la droga, se producía una activación de la Ínsula izquierda, hecho que estos autores interpretaron supuestamente como una activación de la memoria procedimental; mientras que en aquellos sujetos en los que la tarea les provocaba la necesidad o urgencia por consumir la droga, se producía una activación de la Ínsula derecha, que fue interpretado como una potencial activación de la memoria afectiva o emocional.

En apoyo de la posible implicación de la Corteza Insular en la necesidad o ansia por consumir sustancias de abuso, deben incluirse varios estudios recientes. Por ejemplo, Bechara y su grupo (2007) han demostrado que en pacientes fumadores con lesiones de la Ínsula, se elimina el ansia o necesidad de fumar que se produce cuando encuentran en un periodo de deshabituación, hecho que favorece la desintoxicación sin que se produzcan recaídas. De hecho, algunos de los pacientes con daño en la Ínsula manifiestan que han dejado de fumar porque su cuerpo “se ha olvidado de la necesidad de fumar” (Naqvi et al., 2007).

Algunos investigadores consideran que la Corteza Insular puede desempeñar un papel fundamental en la intensa respuesta autonómica que se produce, tras el consumo de una droga y ante los estímulos relacionados con ésta (Volkow et al., 2006). Este hecho, puede ser debido probablemente, a que esta región desempeña un papel fundamental en el procesamiento de la información visceral y en el control de las funciones autonómicas (Cechetto y Saper, 1987; Butcher y Cechetto, 1995; Zhang y Oppenheimer, 1997; 2000;

Hanamori et al., 1998; Bagaev y Aleksandrov, 2006). En este sentido, Contreras y colaboradores (2007), a través de técnicas de c-Fos, han puesto de manifiesto la relevancia del sistema interoceptivo y en particular de la Corteza Insular en la preferencia por un lugar inducida por la administración repetida de anfetaminas, así como en el malestar visceral inducido por la administración de cloruro de litio. La desactivación de esta región cortical mediante lidocaína, pero no de otras áreas adyacentes, elimina la urgencia de los animales por conseguir anfetaminas en una tarea de CPP, y los signos de malestar típicos de la administración del LiCl (Contreras et al., 2007).

Otros autores han propuesto también que, el circuito neuroanatómico implicado en la aparición de estas ansias o cravings por el consumo de las drogas, podría ser el mismo sistema de refuerzo/ motivación sobre el que actúan algunos reforzadores naturales como el sexo (Garavan et al., 2000) o la ingesta de comida (Small et al., 2001; Pelchat et al., 2004). Así, Garavan y colaboradores (2000) comprobaron que las áreas cerebrales que se activan al ver una película con contenido sexual explícito (principalmente el Córtex Prefrontal, el Sistema Límbico y la Corteza Insular), son las mismas que las relacionadas con las ansias por consumir cocaína manifestadas por sujetos dependientes tras ver una película sobre el consumo de cocaína, aunque en este último caso, la activación observada era más intensa. Por otra parte, distintas investigaciones han demostrado también, que la Corteza Insular puede activarse en los casos de intenso deseo o ansias por la ingesta de comida (Small et al., 2001; Pelchat et al., 2004). Este intenso deseo por consumir un determinado alimento y las ansias inducidas por las drogas, provocan la activación de una serie de áreas comunes como serían el Hipocampo, el Núcleo caudado y la Corteza Insular (Pelchat et al., 2004). En general, estas propuestas teóricas coinciden en que el sustrato neurobiológico implicado en el refuerzo inducido por reforzadores naturales como la comida o el sexo, y por las drogas puede ser compartido (Wise, 1996; Kelley y Berridge, 2002; Pelchat et al., 2004). Roy Wise, por ejemplo, considera como muy probable, que las drogas de abuso ejerzan sus efectos biológicos y comportamentales, usurpando los sustratos de refuerzo natural (Wise, 1996). En consonancia con esta propuesta, existen datos que ponen de manifiesto que las ansias, ya sean provocadas por la necesidad de alimento o por el consumo de drogas, pueden estar mediadas en muchos casos, por el sistema de opiáceos endógenos (Cooper y Higgs, 1994; Mercer y Holder, 1997; van Ree et al., 2000; Gerrits et al., 2003).

En resumen, de acuerdo con los datos incluidos en las investigaciones descritas así como por los resultados obtenidos en este capítulo, se podría proponer que la estimulación eléctrica, al actuar sobre la CI Agranular, ha podido activar sistemas recompensa claves



para el establecimiento de asociaciones entre el refuerzo y los estímulos presentes en el entorno durante el proceso de adquisición. Esta puesta en marcha de los sistemas de recompensa, no está sin embargo exenta de otros importantes efectos adicionales, como la tolerancia o la dependencia, sobre todo cuando estos circuitos cerebrales son activados repetidamente de manera análoga a lo que sucede con las drogas de abuso.

**CONCLUSIONES  
FINALES**

---



1. La estimulación eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo (NPBLE) induce comportamientos de preferencia en pruebas de condicionamiento por un lugar (CPPc), aunque simultáneamente origina tres poblaciones de animales diferenciadas, “Positivos” (reforzantes), “Negativos” (aversivos) y “Neutros” (indiferentes).
2. La administración de naloxona, un antagonista opiáceo, bloquea el efecto de preferencia por un lugar inducido por la activación del Núcleo Parabraquial Lateral Externo.
3. Este bloqueo farmacológico del efecto reforzante de la estimulación se produce cuando la tarea se realiza en un contexto nuevo, pero no cuando la naloxona se administra en el mismo laberinto en el que originalmente se desarrolló el aprendizaje.
4. El Núcleo Parabraquial Lateral Externo participa en procesos de aprendizaje discriminativo gustativo aversivo y apetitivo con contigüidad inter-estimular, pero no cuando la modalidad de aprendizaje es demorado. Sin embargo, el aprendizaje adquirido no es retenido cuando se utilizan pruebas de transferencia (tareas de inversión). La activación eléctrica del NPBLE no parece sustentar conductas de autoestimulación eléctrica intracerebral.
5. En pruebas de condicionamiento por un lugar, la estimulación eléctrica de la Corteza Insular Agranular Posterior induce conductas consistentes en grupos diferentes, de preferencia en los animales “positivos”, de aversión o evitación en los animales “negativos”, o de indiferencia en el grupo de animales “neutros”. Esta activación de la Corteza Insular no evoca conductas de autoestimulación eléctrica intracerebral.
6. El efecto reforzante inducido por la activación eléctrica de la CI Agranular Posterior en procedimientos de CPPc, puede ser bloqueado mediante la administración de

naloxona, siempre que se lleve a cabo en un contexto nuevo, pero no si el antagonista opiáceo se administra en el mismo laberinto en el que se desarrolló inicialmente la preferencia.

7. La activación eléctrica de la CI Agranular Posterior induce preferencias gustativas en tareas discriminativas en contigüidad inter-estimular. Sin embargo, este aprendizaje no es transferido cuando son modificadas las contingencias estímulares de la prueba (pruebas de inversión).
8. La estimulación eléctrica repetida de la CI genera una reducción del efecto reforzante, en tareas de aprendizaje discriminativo gustativo con contigüidad inter-estimular.
9. Esta reducción del efecto reforzante, coincide con un incremento en la actividad locomotora vertical (respuestas de alzada/ “rearings” ) de los animales.
10. La administración de naloxona en animales que han sido expuestos de forma repetida a la estimulación eléctrica de la CI Agranular Posterior, provoca una evitación o aversión hacia el lugar del laberinto que previamente había sido preferido.
11. El potencial reforzante de la estimulación eléctrica de la CI Agranular Posterior puede depender del procedimiento de estimulación: Así, la activación diaria de esta región cortical origina un descenso progresivo en el efecto reforzante de la estimulación en tareas de CPPc que no se produce tras la activación en días alternos.
12. Esta reducción en el efecto reforzante tras la estimulación diaria de la CI, es reversible, puesto que un incremento en la intensidad de la corriente eléctrica administrada permite recuperar las preferencias por el lugar estimulado.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- ABRAHAMSEN, G. C.; BERMAN, Y. AND CARR, K. D. (1995). Curve-shift analysis of self-stimulation in food-restricted rats: relationship between daily meal, plasma corticosterone and reward sensitization. *Brain Research*, 695, 186-194.
- ADACHI, A. AND KOBASHI, M. (1985). Chemosensitive neurons within the area Postrema of the rat. *Neuroscience Letters*, 55, 137-140.
- ADACHI, A.; KOBASHI, M. AND FUNAHASHI, M. (1995). Glucose-responsive neurons in the brainstem. *Obesity. Research*, 3 (Suppl. 5): 735S-740S.
- AGMO, A.; GALVAN, A. AND TALAMANTES, B. (1995). Reward and reinforcement produced by drinking sucrose: Two processes that may depend on different neurotransmitters. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 52 (2), 403-414.
- AGÜERO, A. (1990). *Participación del núcleo parabraquial troncoencefálico en el aprendizaje interoceptivo: Disociación comportamental de los diferentes subnúcleos (medial y lateral) en el procesamiento visceral y gustativo*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España.
- AGÜERO, A.; ARNEDO, M.; GALLO, M. AND PUERTO, A. (1993a). The functional relevance of the Lateral Parabraquial Nucleus in Lithium Chloride-induced aversion learning. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 45, 973-978.
- AGÜERO, A.; ARNEDO, M.; GALLO, M. AND PUERTO, A. (1993b). Lesions of the Lateral Parabrachial Nuclei disrupt aversion learning induced by electrical stimulation of the Area Postrema. *Brain Research Bulletin*, 30, 585-592.
- AGÜERO, A.; GALLO, M.; ARNEDO, M.; MOLINA, F. AND PUERTO, A. (1996). Effects of the medial Parabrachial nucleus (PBNm): Taste discrimination and lithium chloride induced aversion learning after delayed and contiguous interstimulus intervals. *Psychobiology*, 24 (4): 265-280.



- AGÜERO, A.; GALLO, M.; ARNEÑO, M.; MOLINA, F. AND 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*, 67, 161-166.
- AGÜERO, A. AND PUERTO, A. (1986). El Área Parabraquial como centro de convergencias sensoriales relacionadas en el Aprendizaje Interoceptivo. *Revista de Psicología General y Aplicada*, 41 (3), 503-511.
- AKIL, H.; MENG, F.; DEVINE, D. P. AND WATSON, S. J. (1997). Molecular and neuroanatomical properties of the endogenous opioid system: Implications for treatment of opiate addiction. *Seminars in Neuroscience*, 9, 70-83.
- ALDEN, M.; BESSON, J. M. AND 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. *The Journal of Comparative Neurology*, 341, 289-314.
- ALEKSANDROV, V. G.; BAGAEV, V. A.; NOZDRACHEV, A. D. AND PANTELEEV, S. S. (1996). Identification of gastric neurones in the rat Insular Cortex. *Neuroscience Letters*, 216: 5-8.
- ALLEN, K. V.; MCGREGOR, I. S.; HUNT, G. E.; SINGH, M. E. AND MALLET, P. E. (2003). Regional differences in naloxone modulation of Delta (9)-THC induced Fos expression in rat brain. *Neuropharmacology*, 44 (2): 264-274.
- ALTIER, N. AND STEWART, J. (1999). The role of Dopamine in The Nucleus Accumbens in analgesia. *Life Sciences*, Vol.65, nº 22, 2269-2287.
- ANAGNOSTARAS, S. G. AND ROBINSON, T. E. (1996). Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: Modulation by associative learning. *Behavioural Neuroscience*, 110, 1397-1414.
- ANDERSON, R.; DIOTTE, M. AND MILIARESSIS, E. (1995). The bidirectional interaction between Ventral Tegmental rewarding and Hindbrain aversive stimulation effects in the rat. *Brain Research*, 688, 15-20.

- ANDRESEN, M. C. AND MENDELOWITZ, D. (1996). Sensory afferent neurotransmission in caudal nucleus Tractus Solitarius-common denominators. *Chemical Sense*, 21 (3): 387-395.
- ANGEL, I.; SCHOEMAKERS, H.; PROUTEA, M.; GARREAN, M. AND LANGER, S. (1993). Litosetine: A selective 5HT uptake inhibitor with concomitant 5HT-3 receptor antagonist and antiemetic properties. *European Journal of Neuroscience*, 232, 139-145.
- APFELBAUM, M. AND MANDENOFF, A. (1981). Naltrexone suppresses hyperphagia induced in the cat by a highly palatable diet. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 15, 89-91.
- ARNEDO, M. (1987). *Bases biológicas del aprendizaje interoceptivo: Una disociación comportamental de los sistemas periféricos implicados en el procesamiento visceral*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- ARNEDO, M.; GALLO, M.; AGÜERO, A.; MOLINA, F. AND PUERTO, A. (1993). Medullary afferent vagal axotomy disrupts NaCl-induced short-term taste aversion learning. *Behavioral and Neural Biology*, 59, 69-75.
- ARNEDO, M.; GALLO, M.; AGÜERO, A. AND PUERTO, A. (1990). Effects of medullary afferent vagal axotomy and Area Postrema lesions on short-term and long-term NaCl-induced taste aversion learning. *Physiology and Behavior*, 47, 1067-1074.
- ARNEDO, M.; GALLO, M.; AGÜERO, A. AND PUERTO, A. (1991). Differential effects of subdiaphragmatic vagotomy on NaCl-induced aversion learning. *Behavioral and Neural Biology*, 55, 141-153.
- ARNEDO, M. AND PUERTO, A. (1986). Funciones del nervio vago en el aprendizaje interoceptivo. *Revista de Psicología General y Aplicada*, 41 (31), 487-494.
- ARNOULD, C. AND AGMO, A. (1999). The importance of the stomach for conditioned place preference produced by drinking sucrose in rats. *Psychobiology*, 27 (4), 541-546.
- ARVANITOGIANNIS, A.; FLORES, C. AND SHIZGAL, P. (1997). Fos-like immunoreactivity in the caudal Diencephalon and Brainstem following Lateral Hypothalamus self-stimulation. *Behavioural Brain Research*, 88, 275-279.

- ARVANITOGIANNIS, A.; TZSCHENTKE, T. M.; RISCALDINO, L.; WISE, R. A. AND SHIZGAL, P. (2000). Fos expression following Self-Stimulation of the Medial Prefrontal Cortex. *Behavioural Brain Research*, 107, 123-132.
- AUGUSTINE, J. R. (1996). Circuitry and functional aspects of the Insular lobe in primates including humans. *Brain Research Reviews*, 22, 229-244.
- AVENA, N. M. AND HOEBEL, B. G. (2003). Amphetamine-sensitized rats show sugar-induced hyperactivity (cross-sensitization) and sugar hyperphagia. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 74, 635-639.
- AZZARA, A. V. AND SCLAFANI, A. (1998). Flavor preferences conditioned by intragastric sugar infusions in rats: Maltose is more reinforcing than sucrose. *Physiology and Behavior*, 64, (4): 535-541.
- BAGAEV, V. AND ALEKSANDROV, V. (2006). Visceral-related area in the rat Insular Cortex. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 125, 16 – 21.
- BAKER, D. A.; KHROYAN, T. V.; O'DELL, L. E.; FUCHS, R. A. AND NEISEWANDER, J. L. (1996). Differential effects of intra-accumbens sulpiride on cocaine-induced locomotion and conditioned place preference. *Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 279 (1): 392-401.
- BAKSHI, V. P. AND KELLEY, A. E. (1994). Sensitization and conditioning of feeding following multiple morphine microinjections into the nucleus Accumbens. *Brain Research*, 648, 342-346.
- BALCELLS-OLIVERO, M. AND VEZINA, P. (1997). Effects of naltrexone on amphetamine-induced locomotion and rearing: acute and repeated injections. *Psychopharmacology*, 131, 230-238.
- BALLEINE, B. W. AND DICKINSON, A. (1998). Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their substrates. *Neuropharmacology*, 37, 407-419.

- BALLEINE, B. W. AND DICKINSON, A. (2000). The effect of lesions of the Insular Cortex on instrumental conditioning: Evidence for a role in incentive memory. *The Journal of Neuroscience*, 20(23): 8954-8964.
- BALS-KUBIK, R.; ABLEITNER, A.; HERZ, A. AND SHIPPENBERG, T. S. (1993). Neuroanatomical sites mediating the motivational effects of opioids as mapped by the Conditioned Place Preference paradigm in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 264 (1), 489-495.
- BARDO, M. T. AND BEVINS, R. A. (2000). Conditioned place preference: What does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology*, 153, 31-43.
- BARDO, M. T.; ROWLETT, J. K. AND HARRIS, M. J. (1995). Conditioned place preference using opiate and stimulant drugs: A meta-analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 19 (1), 39-51.
- BARDO, M. T. AND VALONE, J. M. (1994). Morphine-conditioned analgesia using a taste cue: dissociation of taste aversion and analgesia. *Psychopharmacology*, 114, 269-274.
- BARNABI, F. AND CECHETTO, D. F. (2001). Neurotransmitters in the Thalamus relaying visceral input to the Insular Cortex in the rat. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 281, R1665-R1674.
- BASSAREO, V. AND DI CHIARA, G. (1997). Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *The Journal of Neuroscience*, 17 (2): 851-861.
- BASSO, A. M. AND KELLEY, A. E. (1999). Feeding induced by GABA<sub>A</sub> receptor stimulation within the nucleus Accumbens Shell: regional mapping and characterization of macronutrient and taste preference. *Behavioural Neuroscience*, 113, (2), 324-336.
- BAUCO, P. AND WISE, R. A. (1994). Potentiation of Lateral Hypothalamic and Midline Mesencephalic brain stimulation reinforcement by Nicotine: Examination of repeated treatment. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 271 (1), 294-301.

- BECHARA, A.; HARRINGTON, F.; NADER, K. AND VAN DER KOOY, D. (1992). Neurobiology of motivation: Dissociation of two motivational mechanisms mediating opiate reward in drug-naive versus drug-dependent animals. *Behavioral Neuroscience*, 106 (5), 798-807.
- BECHARA, A.; MARTIN, G. M.; PRIDGAR, A. AND VAN DER KOOY, D. (1993). The Parabrachial Nucleus: A brain-stem substrate critical for mediating the aversive motivational effects of morphine. *Behavioral Neuroscience*, 107 (1), 147-160.
- BECHARA, A.; NADER, K. AND VAN DER KOOY, D. (1995). Neurobiology of withdrawal motivation: Evidence for two separate aversive effects produced in morphine-naive versus morphine-dependent rats by both naloxone and spontaneous withdrawal. *Behavioral Neuroscience*, 109 (1), 91-105.
- BECHARA, A.; NADER, K. AND VAN DER KOOY, D. (1998). A two-separate motivational systems hypothesis of opioid addiction. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 59 (1), 1-17.
- BECHARA, A. AND VAN DER KOOY, D. (1985). Opposite motivational effects of endogenous opioids in brain and periphery. *Nature*. 314 (6011) :533-4.
- BECHARA, A. AND VAN DER KOOY, D. (1987). Kappa receptors mediate the peripheral aversive effects of opiates. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 28, 227-233.
- BECHARA, A. AND VAN DER KOOY, D. (1989). The Tegmental Pedunculopontine Nucleus: A Brain-Stem output of the limbic system critical for the conditioned place preferences produced by morphine and amphetamine. *The Journal of Neuroscience*, 9 (10), 3400-3409.
- BECHARA, A. AND 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. *Behavioural Neuroscience*, 106 (2), 351-363.
- BECHARA, A. AND VAN DER KOOY, D. (1992b). Lesions of the Tegmental Pedunculopontine Nucleus: Effects on the locomotor activity induced by morphine and amphetamine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 42, 9-18.

- BECHARA, A.; ZITO, K. AND VAN DER KOOY, D. (1987). Peripheral receptors mediate the aversive conditioning effects of morphine in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 28, 219-225.
- BECKSTEAD, R. M. AND NORNGREN, R. (1979). An autoradiographic examination of the central distribution of the Trigeminal, Facial, Glossopharyngeal, and Vagal nerves in the monkey. *Journal of Comparative Neurology*, 184 (3), 455-472.
- BEDINGFIELD, J. B.; KING, D. A. AND HOLLOWAY, F. A. (1998). Cocaine and caffeine: Conditioned place preference, locomotor activity, and additivity. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 61 (3), 291-296.
- BEHAN, M. AND HABERLY, L. B. (1999). Intrinsic and efferent connections of the endopiriform nucleus in rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 408, 532-548.
- BELL, S. M.; STEWART, R. B.; THOMPSON, S. C. AND MEISCH, R. A. (1997). Food-deprivation increases cocaine-induced conditioned place preference and locomotor activity in rats. *Psychopharmacology*, 131, 1-8.
- BENINGER, R. J. AND MILLER, R., (1998). Dopamine D1-like receptors and reward-related incentive learning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22 (2), 335-345.
- BENJAMIN, R. M. AND AKERT, K. (1959). Cortical and thalamic areas involved in taste discrimination in the albino rat. *Journal of Comparative Neurology*, 111, 231-260.
- BERKE, J. D. AND HYMAN, S. E. (2000). Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron*, 25, 515-532.
- BERMAN, D. E.; HAZVI, S.; NEDUVA, V. AND DUDAI, Y. (2000). The role of identified neurotransmitter systems in the response of Insular Cortex to unfamiliar taste: Activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *The Journal of Neuroscience*, 20 (18), 7017-7023.
- BERMAN, Y.; DEVI, L. AND CARR, K. D. (1994). Effects of chronic food restriction on prodynorphin derived peptides in rat brain regions. *Brain Research*, 664, 49-53.

- BERMÚDEZ-RATTONI, F.; INTROINI-COLLISON, I. B. AND MCGAUGH, J. L. (1991). Reversible inactivation of the Insular Cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. *Proceedings National Academy Sciences USA.*, 88 (12), 5379-5382.
- BERMÚDEZ-RATTONI, F. AND MCGAUGH, J. L. (1991). Insular cortex and Amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Research*, 549 (1): 165-170.
- BERMÚDEZ-RATTONI, F. AND YAMAMOTO, T. (1998). Neuroanatomy of CTA: lesions studies. En BURES, J., BERMUDEZ-RATTONI, F. AND YAMAMOTO, T.: *Conditioned taste aversion. Memory of a special kind*. Oxford University Press, pp.28-44.
- BERNARD, J. F.; ALDEN, M. AND 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. *The Journal of Comparative Neurology*, 329, 201-229.
- BERNARD, J. F. AND BANDLER, R. (1998). Parallel circuits for emotional coping behavior: New pieces in the puzzle. *The Journal of Comparative Neurology*, 401, 429-436.
- BERNARD, J. F.; CARROUÉ, J. AND BESSON, J. M. (1991). Efferent projections from the External Parabrachial Area to the Forebrain: A Phaseolus Vulgaris Leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience Letters*, 122, 257-260.
- BERNARD, J. F.; DALLEL, R.; RABOISSON, P.; VILLANUEVA, L. AND LE BARS, D. (1995). Organization of the efferent projections from the spinal cervical enlargement to the Parabrachial area and Periaqueductal Gray: A PHA-L study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 353, 480-505.
- BERNARD, J. F.; HUANG, G. F. AND BESSON, J. M. (1994). The Parabrachial Area: Electrophysiological evidence for an involvement in visceral nociceptive processes. *Journal of Neurophysiology*, 71 (5), 1646-1660.

- BERNARDIS, L. L. AND BELLINGER, L. L. (1998). The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, 218 (4): 284-306.
- BERNSTEIN, I. L.; CHAVEZ, M.; ALLEN, D. AND TAYLOR, E. M. (1992). Area Postrema mediation of physiological and behavioural effects of lithium chloride in the rat. *Brain Research*, 575, 132-137.
- BERNSTEIN, M. A. AND WELCH, S. P. (1998).  $\mu$ -Opioid receptor down-regulation and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation in a mouse model of chronic morphine tolerance. *Molecular Brain Research*, 55 (2): 237-242.
- BERRIDGE, K. C. (1991). Modulation of taste affect by hunger, caloric satiety and sensory-specific satiety in the rat. *Appetite*, 16, 103-120.
- BERRIDGE, K. C. (1996). Food reward: Brain substrates of wanting and liking. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 20 (1), 1-25.
- BERRIDGE, K. C. (2000). Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24, 173-198.
- BERRIDGE, K. C. AND PECIÑA, S. (1995). Benzodiazepines, appetite, and taste palatability. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 19 (1), 121-131.
- BERRIDGE, K. C. AND ROBINSON, T. E. (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research Reviews*, 28(3), 309-369.
- BESSON, C. AND LOUILOT, A. (1997). Striatal dopaminergic changes depend on the attractive or aversive value of stimulus. *Neuroreport*, 8 (16), 3523-3526.
- BESSON, J. M.; BESSE, D. AND LOMBARD, M. C. (1994). Opioid receptors in the superficial layers of the dorsal horn of the rat spinal cord and deafferentation pain, *Regulatory Peptides*, 53 (Suppl.1), S67-S68.



- BESTER, H.; BESSON, J. M. AND BERNARD, J. F. (1997). Organization of efferent projections from the Parabrachial area to the Hypothalamus: A Phaseolus Vulgaris-Leucoagglutinin study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 383, 245-281.
- BESTER, H.; MATSUMOTO, N.; BESSON, J. M. AND BERNARD, J. F. (1997). Further evidence for the involvement of the Spinoparabrachial pathway in nociceptive processes: A c-Fos study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 383, 439-458.
- BESTER, H.; MENENDEZ, L.; BESSON, J. M. AND BERNARD, J. F. (1995). Spino-(Trigemino)- Parabrachiohypothalamic Pathway: Electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *Journal of Neurophysiology*, 73 (2), 568-585.
- BIELAJEW, C.; DIOTTE, M. AND MILIARESSIS, E. (2003). Effects of naloxone on rewarding and aversive brain sites. *Behavioural Brain Research*, 143 (1), 75-83.
- BIELAJEW, C. AND SHIZGAL, P. (1986). Evidence implicating descending fibers in self-stimulation of the medial forebrain bundle. *The Journal of Neuroscience*, 6 (4): 919-929.
- BIELAVSKA, E. AND BURES, J. (1994). Universality of Parabrachial mediation of conditioned taste aversion. *Behavioural Brain Research* 60, 35-42.
- BIELAVSKA, E.; MIKSIK, I. AND KRIVANEK, J. (2000). Glutamate in the Parabrachial Nucleus of rats during conditioned taste aversion. *Brain Research*, 887, 413-417.
- BINDRA, D. (1974). A motivational view of learning, performance, and behavior modification. *Psychological Review*, 81 (3), 199-213.
- BIRK, J. AND NOBLE, R. G. (1981). Naloxone antagonism of diazepam-induced feeding in the Syrian hamster. *Life Sciences*, 29, 1125-1131.
- BLOCK, C. H. AND HOFFMAN, G.E. (1987). Neuropeptide and monoamine components of the Parabrachial pontine complex. *Peptides*, 8, 267-283.
- BLOKHINA, E. A.; SUKHOTINA, I. A. AND BESPALOV, A. Y. (2000). Pretreatment with morphine potentiates naloxone-conditioned place aversion in mice: effects of NMDA receptor antagonists. *European Journal of Pharmacology*, 406 (2):227-32.

- BODNAR, R. (1996). Opioid receptor subtype antagonists and ingestion. En: Cooper, S. J. and Clifton, P. G.: *Drug receptor subtypes and ingestive behavior*. Academic Press, pp.127-146.
- BODNAR, R. J. (2004). Endogenous opioids and feeding behavior: a 30-year historical perspective. *Peptides*, 25 (4), 697-725.
- BODNAR, R. J.; GLASS, M. J.; RAGNAUTH, A. AND COOPER, M. L. (1995). General, mu and kappa opioid antagonists in the Nucleus Accumbens alter food intake under deprivation, glucoprivic and palatable conditions. *Brain Research*, 700, 205-212.
- BODNAR, R. J. AND HADJIMARKOU, M. M. (2003). Endogenous opiates and behavior: 2002. *Peptides*, 24, 1241-1302.
- BONCI, A.; BERNARDI, G.; GRILLNER, P. AND MERCURI, N. B. (2003). The dopanime-containing neuron: Maestro or simple musician in the orchestra of addiction? *Trends in Pharmacological Sciences*, 24 (4), 172-177.
- BONSON, K. R.; GRANT, S. J.; CONTOREGGI, C. S.; LINKS, J. M.; METCALFE, J.; WEYL, H. L.; KURAIN, V. ERNST, M.; AND LONDON, E. D. (2002). Neural systems and cue-induced cocaine craving. *Neuropsychopharmacology*, 26, 376-386.
- BOOTH, D. A. (1985). Food-conditioned eating preferences and aversions with interoceptive elements: Conditioned appetites and satieties. En: *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 443, pp. 22-41.
- BORMANN, N. M. AND OVERTON, D. A. (1996). The relative salience of morphine and contextual cues as conditioned stimuli. *Psychopharmacology*; 123:164-171
- BOURGEAIS, L.; MOCONDUIT, L.; VILLANUEVA, L. AND BERNARD, J. F. (2001). Parabrachial internal lateral neurons convey nociceptive messages from the deep laminae of the Dorsal Horn to the Intralaminar Thalamus. *The Journal of Neuroscience*, 21 (6), 2159-2165.
- BOZARTH, M. A. (1987a). Neuroanatomical boundaries of the reward-relevant opiate-receptor field in the Ventral Tegmental Area as mapped by conditioned place preference method in rats. *Brain Research*, 414, 77-84.

- BOZARTH, M. A. (1987b). Conditioned Place Preference: A parametric analysis using systemic heroin injections. En: Bozarth (Ed.), *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs* (pp. 241-273). New York: Springer-Verlag.
- BOZARTH, M. A. (1994). Pleasure systems in the brain. En: Warburton, D. M. (Ed.), *Pleasure: The politics and the reality* (pp. 5-16). New York: John Wiley and Sons.
- BOZARTH, M. A. AND WISE, R. A. (1982). Localization of the reward-relevant opiate receptors. En Harris, L. S. (Ed.), *Problems of drug dependence*, 41, pp. 158-164. National Institute on Drug Abuse Research Monograph. Washington, DC: U.S. Government Printing Office.
- BRADLEY, K. C. AND MEISEL, R. L. (2001). Sexual behavior induction of c-Fos in the nucleus Accumbens and amphetamine-stimulated locomotor activity are sensitized by previous sexual experience in female Syrian hamsters. *The Journal of Neuroscience*, 21 (6), 2123-2130.
- BRADSHAW, C. M. AND SZABADI, E. (1989). Central neurotransmitter systems and the control of operant behavior by “natural” positive reinforcers. En: Lieberman, J.M. y Cooper, S.J. *The Neuropharmacological Basis of Reward*, Cap. 8, 320-376. Oxford University Press.
- BRANDÃO, M. L.; ANSELONI, V. Z.; PANDOSSIO, J. E.; DE ARAUJO, J. E. AND CASTILHO, V. M. (1999). Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal Midbrain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23, 863-875.
- BRAUN, J. J. (1990). Gustatory cortex: Definition and function. En: Kolb, B. and Tees, R. C. (Eds.): *The cerebral cortex of the rat*, The MIT Press, pp.407-430.
- BRITTON, D. R.; BRITTON, K. T.; DALTON, D. AND VALE, W. (1981). Effects of naloxone on anti-conflict and hyperphagic actions of diazepam. *Life Sciences*, 29, 1297-1302.
- BROOKS, J. C. W.; ZAMBREANU, L.; GODINEZ, A.; CRAIG, A. D. B. AND TRACEY, I. (2005). Somatotopic organisation of the human insula to painful heat studied with high resolution functional imaging. *NeuroImage*, 27, 201-209.

- BROWN, E. E. AND FIBIGER, H. C. (1993). Differential effects of excitotoxic lesions of the Amygdala on cocaine-induced conditioned locomotion and conditioned place preference. *Psychopharmacology (Berl.)*, 133 (1), 123-130.
- BURES, J.; BERMUDEZ-RATTONI, F. AND YAMAMOTO, T. (1998). *Conditioned Taste Aversion: Memory of a special kind*. O.U.P. Oxford.
- BURITOVA, J.; BESSON, J. M. AND BERNARD, J. M. (1998). Involvement of the Spinoparabrachial Pathway in Inflammatory Nociceptive Processes: A c-Fos protein study in the awake rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 397, 10-28.
- BURKEY, A. R.; CARSTENS, E. AND JASMIN L. (1999). Dopamine reuptake inhibition in the rostral agranular Insular Cortex produces antinociception. *The Journal of Neuroscience*, 19 (10): 4169-4179.
- BURKEY, A. R.; CARSTENS, WENNIGER, J. J. E. AND JASMIN L. (1996). An opioidergic cortical antinociception triggering site in the agranular Insular Cortex of the rat contributes to morphine antinociception. *The Journal of Neuroscience*, 16 (20): 6612-6623.
- BUTCHER, K. S. AND CECHETTO, D. F. (1995). Autonomic responses of the Insular Cortex in hypertensive and normotensive rats. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 268, 214-222.
- BUTCHER, K. S. AND CECHETTO, D. F. (1998). Neurotransmission in the Medulla mediating Insular Cortical and Lateral Hypothalamic Sympathetic responses. *Canadian Journal Physiology and Pharmacology*, 76, 737-746.
- CABANAC, M. (1971). Physiological role of pleasure. *Science*, 173, 1103-1107.
- 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 Research*, 647, 242-248.
- CAINE, S. B. AND KOOB, G. F. (1994). Effects of dopamine D-1 and D-2 antagonists on cocaine self-administration under different schedules of reinforcement in the rat. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*; 270 (1): 209-18.

- CAMÍ, J. AND FARRÉ, M. (2003). Drug Addiction. *New England Journal of Medicine*, 349: 975-986.
- CANNON, C. M. AND BSEIKRI, M. E. (2004). Is dopamine required for natural reward? *Physiology and Behavior*, 81, 741- 748.
- CANNON, C. M. AND PALMITER, R. D. (2003). Reward without dopamine. *The Journal of Neuroscience*, 23 (34), 10827-10831.
- CAPDEVILA-ORTIS, L.; SEGURA-TORRES, P. AND MORGADO-BERNAL, I. (1988). Implicación del sustrato nervioso del refuerzo en los procesos de aprendizaje. *Memoria. Archivos de Neurobiología*, 51(5), 269-277.
- CARDINAL, R. N.; PARKINSON, J. A.; HALL, J. AND EVERITT, B. J. (2002). Emotion and motivation: the role of the Amygdala, Ventral Striatum, and Prefrontal Cortex. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26, 321-352.
- CARLEZON, W. A. AND WISE, R. A. (1993). Morphine-induced potentiation of brain stimulation reward is enhanced by MK-801. *Brain Research*, 620: 339-342.
- CARLSON, D. E.; NABAVIAN, A. M. AND GANN, D. S. (1994). Corticotropin-releasing hormone but not glutamate elicits hormonal responses from the Parabrachial region in cats. *American Journal of Physiology*, 267, R337-R348.
- CARR, D. G.; FIBIGER, H. C. AND PHILLIPS, A. G. (1989). Conditioned place preference as a measure of drug reward. En: Liebman, J.M. y Cooper, S.J. *The Neuropharmacological basis of reward*, Cap. 7, pp. 264-319, Oxford University Press.
- 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: Behavioural evidence and underlying mechanism. *Physiology and Behavior*, 76, 353-364.

- CARR, K. D.; ALEMAN, D. O.; BAK, T. H. AND SIMON, E. J. (1991). Effects of Parabrachial opioid antagonism on stimulation-induced feeding. *Brain Research*, 545, 283-286.
- CARR, K. D.; KIM, G. Y. AND CABEZA DE VACA, S. (2000). Chronic food restriction in rats augments the central rewarding effect of cocaine and the delta 1 opioid agonist, DPDPE, but not the delta 2 agonist, deltorphin II. *Psychopharmacology (Berl.)*, 152 (2): 200-207.
- CARR, K. D. AND 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.; KUTCHUKHIDZE, N. AND PARK, T. H. (1999). Differential effects of  $\mu$  and  $\kappa$  opioid antagonists on Fos-like immunoreactivity in Extended Amygdala. *Brain Research*, 822, 34-42.
- CARR, K. D. AND 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.; PARK, T. H. AND STONE, E. A. (1998). Neuroanatomical patterns of Fos-like immunoreactivity induced by naltrexone in food-restricted and libitum fed rats. *Brain Research*, 779, 26-32.
- CARR, K. D. AND 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.
- CASEY, K. L.; SVENSSON, P.; MORROW, T. J.; RAZ, J.; JONE, C.; AND MINOSHIMA, S. (2000). Selective opiate modulation of nociceptive processing in the human brain. *Journal of Neurophysiology*, 84 (1): 525-533.
- CECHETTO, D. F. (1987). Central representation of visceral function. *Federation Proceedings*, 46, 17-23.
- CECHETTO, D. F. AND SAPER, C. B. (1987). Evidence for a viscerotopic sensory representation in the Cortex and Thalamus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 262, 27-45.

- CERVO, L. AND SAMANIN, R. (1995). Effects of dopaminergic and glutamatergic receptor antagonists on the acquisition and expression of cocaine conditioning place preference. *Brain Research*; 673 (2): 242-50.
- CHAMBERLIN, N. L. AND SAPER, C. R. (1995). Differential distribution of AMPA-selective Glutamate receptor subunits in the Parabrachial Nucleus of the rat. *Neuroscience*, 68 (2), 435-443.
- CHAMBERLIN, N. L., MANSOUR, A., WATSON, S. J. AND SAPER, C. B. (1999). Localization of mu-opioid receptors on amygdaloid projection neurons in the Parabrachial Nucleus of the rat. *Brain Research*, 827, 198-204.
- CHAMBERS, K. C. (1990). A neural model for conditioned taste aversions. *Annual Review of Neuroscience*, 13, 373-385.
- CHEFER, V. I.; MORÓN, J. A.; HOPE, B. REA, W. AND SHIPPENBERG, T. S. (2000). Kappa-opioid receptor activation prevents alterations in mesocortical dopamine neurotransmission that occur during abstinence from cocaine. *Neuroscience*, 101 (3): 619-27.
- CHEN, T.; HUI, R.; DONG, Y.X.; LI, Y.Q. AND MIZUNO, N. (2004). Endomorphin 1- and endomorphine 2-like immunoreactive neurons in the Hypothalamus send axons to the Parabrachial nucleus in the rat. *Neuroscience Letters*, 357 (2), 139-142.
- CHIKAMA, M.; MCFARLAND, N. R.; AMARAL, D. G. AND HABER, S. N. (1997). Insular cortical projections to functional regions of the Striatum correlate with cortical cytoarchitectonic organization in the primate. *Journal of Neuroscience*, 17 (24), 9686-9705.
- CHILDRESS, A. R.; MOZLEY, P. D.; MCELGIN, W. FITZGERALD, J.; REIVICH, M.; O'BRIEN, C. P. (1999). Limbic activation during cue-induced cocaine craving. *American Journal Psychiatry*, 156, 11-18.
- CLASCÁ, F.; LLAMAS, A. AND REINOSO-SUÁREZ, F. (1997). Insular cortex and neighbouring fields in the cat: A redefinition based on cortical microarchitecture and connections with the Thalamus. *The Journal of Comparative Neurology*, 384, 456-482.

- COBOS, A.; LIMA, D.; ALMEIDA, A. AND TAVARES, I. (2003). Brain afferents to the lateral caudal ventrolateral Medulla: A retrograde and anterograde tracing study in the rat. *Neuroscience*, 120, 485-498.
- COHEN, N. J. AND EICHENBAUM, H. (1994). Memory, amnesia, and the hippocampal system. Cambridge, M. A.: MIT Press.
- COIL, J. AND NORGREN, R. (1981). Taste aversions conditioned with intravenous copper sulphate: Attenuation by ablation of the area Postrema. *Brain Research*, 212, 425-433.
- COIMBRA, N. C.; EICHENGERGER, G. C. D.; GORCHINSKI, R. T. AND MAISONNETTE, S. (1996). Effects of the blockade of opioid receptor on defensive reactions elicited by electrical stimulation within the deep layers of the superior Colliculus and DPAG. *Brain Research*, 736, 348-352.
- COIMBRA, N. C.; OSAKI, M. Y.; EICHENGERGER, G. C. D.; CISCATO JR, J. G.; JUCÁ, C. E. B. AND BIOJOE, C. R. (2000). Effects of opioid receptor blockade on defensive behavior elicited by electrical stimulation of the aversive substrates of the inferior Colliculus in *Rattus Norvegicus* (Rodentia, Muridae). *Psychopharmacology*, 152: 422-430.
- CONOVER, K. L. AND SHIZGAL, P. (1994). Differential effects of postingestive feedback on the reward value of sucrose and lateral hypothalamic stimulation in rats. *Biobehavioral Neuroscience*, 108 (3) 559-572.
- CONOVER, K. L. AND SHIZGAL, P. (1994). Competition and summation between rewarding effects of sucrose and lateral hypothalamic stimulation in the rat. *Behavioural Neuroscience*, 108 (3), 537-548.
- CONTARINO, A.; DRAGO, F.; ZANOTTI, A.; NATOLINO, F.; BERTI, T. AND GIUSTI, P. (1999). A new place conditioning paradigm to study tolerance to opiates in mice. *NeuroReport*, 10, 517-521.
- CONTRERAS, M.; CERIC, F. AND TORREALBA F. (2007). Inactivation of the interoceptive Insula disrupts drug craving and malaise induced by lithium. *Science* 318, 655-658.



- CONTRERAS, R. J.; BECKSTEAD, R. M. AND NORGREN, R. (1982). The central projections of the Trigeminal, Facial, Glossopharyngeal and Vagus nerves: an autoradiographic study in the rat, *Journal of the Autonomic Nervous System*, 6, 303–322.
- COOPER, S. J. AND HIGGS, S. (1994). Neuropharmacology of appetite and taste preferences. En: Legg, C. R. and Booth, D. A. (Eds.) *Appetite: Neural and Behavioural Bases*, OUP, pp. 212-241.
- COOPER, S. J. AND HIGGS, S. (1996). Benzodiazepine receptors and the determination of palatability. En: Cooper, S. J. and Clifton, P. G.: *Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior*. Academic Press, pp. 347-368.
- COOPER, S. J.; FRANCIS, J.; AL-NASE, H. AND BARBER, D. (1992). Evidence for dopamine D-1 receptor-mediated facilitatory and inhibitory effects on feeding Behavior in rats. *Journal of Psychopharmacology*, 6 (1): 27-33.
- CORBETT, D. AND WISE, R. A. (1980). Intracranial self-stimulation in relation to the ascending dopaminergic systems of the midbrain: A moveable electrode mapping study. *Brain Research*, 185, 1-15.
- CORRIGALL, V. A. AND COEN, K. M. (1991). Cocaine self-administration is increased by both D1 and D2 dopamine antagonists. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*; 39 (3): 799-802.
- CRAIG, A. D. AND DOSTROVSKY, J. O. (1999). Medulla to Thalamus. En: Wall, P. D. and Melzack, R (Eds): *Textbook of Pain*, Fourth Edit. Churchill Livingstone.
- CUBERO, I. (1995). *Análisis Funcional del eje cortico-parabraquial en el aprendizaje gustativo*. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, España.
- CUBERO, I.; LOPEZ, M.; NAVARRO, M. AND PUERTO, A. (2001). Lateral Parabrachial lesions impair taste aversion learning induced by blood-borne visceral stimuli. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 69, 157-163.
- CUBERO, I. AND PUERTO, A. (2000). Electrical stimulation of the Insular Cortex induces flavor-preferences in rats. *Brain Research*, 872, 134-140.

- CUBERO, I. AND PUERTO, A. (2000b). Lateral Parabrachial Lesions impair intraperitoneal but not intraventricular methylscopolamine-induced taste aversion learning. *Brain Research*, 871, 113-119.
- CUBERO, I.; THIELE, T. E. AND BERNSTEIN, I. L. (1999). Insular cortex lesions and taste aversion learning effects of conditioning methods and timing of lesion. *Brain Research*, 839, 323-330.
- CUNNINGHAM, E.; MISELIS, R. AND SAWCHENCO, P. (1994). The relationship of efferents projections from the area Postrema to the Vagal motor and Brain Stem catecholamine-containing cell groups: An axonal transport and immunohistochemical study in the rat. *Neuroscience*, 58 (3): 635-648.
- D'ANCI, K. E.; KANAREK, R. B. AND MARKS-KAUFMAN, R. (1997). Beyond sweet taste: Saccharin, sucrose, and polycose differ in their effects upon morphine-induced analgesia. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 56 (3), 341-345.
- DATE, Y.; UETA, Y.; YAMASHITA, H.; YAMAGUCHI, H.; MATSUKURA, S.; KANGAWA, K.; SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M. AND NAKAZATO, M. (1999). Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proceedings National Academy Sciences USA*, 96, 748-753.
- DATICHE, F. AND CATTARELLI, M (1996). Reciprocal and topographic connections between the Piriform and Prefrontal cortices in the rat: A tracing study using by submit of the Cholera toxin. *Brain Research Bulletin*, 41 (6), 391-398.
- DAVIS, B. J. (1991). The Ascending Gustatory Pathway: A Golgi Analysis of the Medial and Lateral Parabrachial Complex in the Adult Hamster. *Brain Research Bulletin* 27, 63-73.
- DAVIS, J. D. (1999). Some new developments in the understanding of oropharyngeal and postingestional controls of meal size. *Nutrition*, 15, (1): 32-39.
- DAYAN, P. AND BALLEINE, B. W. (2002). Reward, motivation, and reinforcement learning. *Neuron*, 36 (10), 285-298.

- DE LACALLE, S. AND SAPER, B. (2000). Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity marks putative visceral sensory pathways in human brain. *Neuroscience*, 100 (1), 115-130.
- DE COUTEAU, W. E.; KESNER, R. P. AND WILLIAMS, J. M. (1997). Short-term memory for food reward magnitude: The role of the Prefrontal cortex. *Behavioral Brain Research*, 88, 239-249.
- DE VRIES, T. AND SHIPPENBERG, T. S. (2002). Neural systems underlying opiate addiction. *The Journal of Neuroscience*, 22 (9), 3321-3325.
- DELAMATER, A. R.; SCLAFANI, A. AND BODNAR, R. J. (2000). Pharmacology of sucrose-reinforced place-preference conditioning: Effects of naltrexona. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 65 (4), 697-704.
- DELGADO, J. M.; ROBERTS, W. W. AND MILLER, N. E. (1954). Learning motivated by electrical stimulation of the brain. *The American Journal of Physiology*, 179: 587-593.
- DESBOIS, C. AND VILLANUEVA, L. (2001). The organisation of lateral ventromedial thalamic connections in the rat: A link for the distribution of nociceptive signals to widespread cortical regions. *Neuroscience*, 102 (4), 885-898.
- DEUTSCH, J. A. (1964). Behavioural measurement of the neural refractory period and its application to intracranial self-stimulation. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 58, 1-9.
- DEUTSCH, J. A. AND DEUTSCH, D. (1973). Learning and intracranial self-stimulation. En: Deutsch, J. A. and Deutsch, D. (Eds.). *Physiological Psychology*, The Dorsey Press, cap. 14, pp. 504-550.
- DEUTSCH, J. A.; MOLINA, F. AND PUERTO, A. (1976). Conditioned taste aversion caused by palatable non toxic nutrients. *Behavioural Biology* 16, 161-174.
- DEUTSCH, J. A. AND TABUENA, J. A. (1986). Learning of gastrointestinal satiety signals. *Behavioural and Neural Biology*, 45, 292-299.

- DEVOTO, P.; FLORE, G.; PIRA, L.; DIANA, M. AND GESSA, G. L. (2002). Co-release of noradrenaline and dopamine in the Prefrontal cortex after acute morphine and during morphine withdrawal. *Psychopharmacology*, 160, 220-224.
- DI CHIARA, G. AND NORTH, A. (1992). Neurobiology of opiate abuse. *Trends in Pharmacological Sciences*, 13, 185-192.
- DI CHIARA, G. AND TANDA, G. (1997). Blunting of reactivity of dopamine transmission to palatable food: A biochemical marker of anhedonia in the CMS model? *Psychopharmacology*, 134, 351-353.
- DI LORENZO, P. M. (1988). Taste responses in the Parabrachial pons of decerebrate rats. *Journal of Neurophysiology*, 59 (6), 1871-1887.
- DI LORENZO, P. M. AND HECHT, G. (1993). Perceptual consequences of electrical stimulation in the gustatory system. *Behavioural Neuroscience*, 107 (1), 130-138.
- DI LORENZO, P. M. AND MONROE, S. (1992). Corticofugal input to taste responsive units in the Parabrachial pons. *Brain Research Bulletin* 29, 925-930.
- DI LORENZO, P. M. AND MONROE, S. (1997). Transfer of information about taste from the Nucleus of the Solitary Tract to the Parabrachial Nucleus of the pons. *Brain Research*, 763, 167-181.
- DING, Y. Q.; KANEKO, T.; NOMURA, S. AND MIZUNO, N. (1996). Immunohistochemical localization of  $\mu$ -opioid receptors in the Central Nervous System of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 367, 375-402.
- DIOTTE, M.; MIGUELEZ, M.; MILIARESSIS, E. AND BIELAJEW, C. (2000). Interactions between rewarding Lateral Hypothalamic and aversive Nucleus Reticularis Gigantocellularis stimulation. *Behavioural Brain Research*, 116, 149-156.
- DOBOLYI, A.; IRWIN, S.; MAKARA, G.; USDIN, T. B. AND PALKOVITS, M. (2005). Calcitonin gene-related peptide-containing pathways in the rat forebrain. *The Journal of Comparative Neurology*, 489, 92-119.

- DOGTERON, G. J. AND VAN HOFF, H. W. (1988). Attenuation of neophobia and conditioned taste aversion in the rabbit. *Behavioural Brain Research*, 28, 253-257.
- DOMJAN, M. (1985). Cue-consequence specificity and long-delay learning revisited. En: *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 443, pp. 54-66.
- DOYLE, T. G.; BERRIDGE, K. C. AND GOSNELL, B. A. (1993). Morphine enhances hedonic taste palatability in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 46, 745-749.
- DREWNOWSKI, A. (1997). Taste preferences and food intake. *Annual Review Nutrition*, 17, 237-253.
- DREWNOWSKI, A.; KRAHN, D. D.; DEMITRACK, M. A.; NAIRN, K. AND GOSNELL, B. A. (1992). Taste responses and preferences for sweet high-fat foods: Evidence for opioid involvement. *Physiology and Behavior*, 51, 371-379.
- DROUIN, C.; DARRACQ, L.; TROVERO, F.; BLANC, G.; GLOWINSKI, J.; COTECCHIA, S.; AND TASSIN, J.-P. (2002).  $\alpha$ 1b-Adrenergic receptors control locomotor and rewarding effects of psychostimulants and opiates. *The Journal of Neuroscience*, 22 (7): 2873-2884.
- DUM, J.; GRAMSCH, C. H. AND HERZ, A. (1983). Activation of hypothalamic  $\beta$ -endorphin pools by reward induced by highly palatable food. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 18, 403-414.
- DUNCAN, G. H.; KUPERS, R. C.; MARCHAND, S. AND VILLEMURE, J. (1998). Stimulation of human Thalamus for pain relief: Possible modulatory circuits revealed by positron emission tomography. *Journal of Neurophysiology*, 80: 3326-3330.
- DUNN, L. T. AND EVERITT, B. J. (1988). Double dissociation 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. *Behavioural Neuroscience*, 102 (1), 3-23.
- DUPONT, S.; BOUILLERET, V.; HASBOUN, D. AND SEMAH, F. (2003). Functional anatomy of the Insula: New insights from imaging. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 25, 113-119.

- EDWARDS, G. L. AND RITTER, R. C. (1981). Ablation of the area Postrema caused exaggerated consumption of preferred foods in the rat. *Brain Research*, 216, 265-276.
- EDWARDS, G. L. AND RITTER, R. C. (1989). Lateral Parabrachial lesions attenuate ingestive effects of Area Postrema lesions. *American Journal of Physiology*, 256, R306-R312.
- EICHENBAUM, H. (2002). *The Cognitive Neuroscience of Memory: An Introduction*, OUP.
- EINCHENBERGER, G. C. D.; RIBEIRO, S. J.; OSAKI, M. Y.; MARUOKA, R. Y.; RESENDE, G. C. C.; CASTELLAN-BALDAN, L.; CORREA, S. A. L.; DA SILVA, L. A. AND COIMBRA, N. C. (2002). Neuroanatomical and psychopharmacological evidence for interaction between opioid and GABAergic neural pathways in the modulation of fear and defence elicited by electrical and chemical stimulation of the deep layers of the superior Colliculus and dorsal Periaqueductal Grey Matter. *Neuropharmacology*, 42, 48-59.
- ELIAS, C. F.; KELLY, F.; LEE, C. E.; AHIMA, R. S.; DRUCKER, D. J.; SAPER, C. B. AND ELMQUIST, J. K. (2000). Chemical characterisation of leptin-activated neurons in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 423, 261-281.
- ELLIOTT, R.; FRISTON, K. J. AND DOLAN, R. (2000). Dissociable neural responses in human reward systems. *The J. of Neuroscience*, 20 (16), 6159-6165.
- ENGBLOM, D.; EK, M.; HALLBECK, M.; ERICSSON-DAHLSTRAND, A. AND BLOMQUIST, A. (2000). Distribution of prostaglandin EP<sub>3</sub> and EP<sub>4</sub> receptor mRNA in the rat Parabrachial nucleus. *Neuroscience Letters*, 281, 163-166.
- ENGSTRÖM, L.; ENGBLOM, D.; ÖRTEGREN, U.; MACKERLOVA, L.; PAUES, J. AND BLOMQUIST, A. (2001). Preproenkephalin mRNA expression in rat Parabrachial neurons: relation to cells activated by systemic immune challenge. *Neuroscience Letters*, 316, 165-168.
- EPSTEIN, L. H.; TRUESDALE, R.; WOJCIK, A.; PALUCH, R. A. AND RAYNOR, H. A. (2003). Effects of deprivation on hedonics and reinforcing value of food. *Physiology and Behavior*, 78, 221-227.

- ERDTMANN-VOURLIOTIS, M.; MAYER, P.; RIECHERT, U.; GRECKSCH, G. AND HÖLLT V. (1998). Identification of brain regions that are markedly activated by morphine in tolerant but not in naive rats. *Molecular Brain Research*, 61, 51–61.
- ESCOBAR, M. L. AND BERMUDEZ-RATTONI, F., (2000). Long-term potentiation in the Insular Cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Research*, 852, 208-212.
- ESCOBAR, M.; FERNANDEZ, J.; GUEVARA AGUILAR, R. Y BERMÚDEZ-RATTONI, F. (1989). Fetal brain grafts induce recovery of learning deficits and connectivity in rats with Gustatory Neocortex lesion. *Brain Research*, 478, 368-374.
- EVANS, K. R. AND VACCARINO, F. J. (1990). Amphetamine- and morphine-induced feeding: Evidence for involvement of reward mechanism. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 14, 9-22.
- EVERITT, B. J.; DICKINSON, A. AND ROBBINS, T. W. (2001). The neuropsychological basis of addictive behavior. *Brain Research Reviews*, 36: 129-138.
- EVERITT, B. J. AND WOLF, M. E. (2002). Psychomotor stimulant addiction: A neural systems perspective. *The Journal of Neuroscience*, 22 (9), 3312-3320.
- FAY, R. AND KUBIN, L. (2000). Pontomedullary distribution of 5-HT<sub>2a</sub> receptor-like protein in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 418, 323-345.
- FEATHERSTONE, R. E. AND MC DONALD, R. J. (2004). Dorsal Striatum and stimulus-response learning: lesions of the Dorsolateral, but not Dorsomedial, Striatum impair acquisition of a stimulus-response-based instrumental discrimination task, while sparing conditioned place preference learning. *Neuroscience*, 124 (1): 23-31.
- FENU, S.; BASSAREO, V. AND DI CHIARA, G. (2001). A role of Dopamine D1 receptors of the Nucleus Accumbens Shell in conditioned taste aversion learning. *The Journal of Neuroscience*, 21(17), 6897-6904.
- FERNANDEZ-ESPEJO, E. (2002). Bases neurobiológicas de la drogadicción. *Revista de Neurología*, 34 (7), 659-664.

- FERSSIWI, A., CARDO, B. AND VELLE, L. (1987). Electrical self-stimulation in the Parabrachial area is depressed after ibotenic acid lesion of the lateral Hypothalamus. *Behavioural Brain Research*, 25, 109-116.
- FINGER, T. H. AND MORITA, Y. (1985). Two gustatory systems: Facial and vagal gustatory nuclei have different brainstem connections. *Science*, 227, 776-778.
- FITZAKERLEY, J. L. AND LUCIER, G. E. (1988). Connections of a vagal communicating branch in the ferret II. Central projections. *Brain Research Bulletin*, 20 (4): 479-486.
- FLORES, C.; ARVANITOGIANNIS, A. AND SHIZGAL, P. (1997). Fos-like immunoreactivity in forebrain regions following self-stimulation of the lateral Hypothalamus and the Ventral Tegmental Area. *Behavioural Brain Research*, 87, 239-251.
- FLYNN, F. G.; BENSON, D. F. AND ARDILAS, A. (1999). Anatomy of the Insula-functional and clinical correlates. *Aphasiology*, 13 (1), 55-78.
- FRANCIS, S.; ROLLS, E. T.; BOWTELL, R.; MCGLONE, F.; O'DOHERTY, J.; BROWNING, A.; CLARE, S. AND SMITH, E. (1999). The representation of pleasant touch in the brain and its relationship with taste and olfactory areas. *NeuroReport*, 10, 453-459.
- FRANKLIN, K. B. J. (1998). Analgesia and abuse potential: An accidental association or a common substrate? *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59 (4), 993-1002.
- FRANKLIN, T. R. F.; ACTON, P. D.; MALDJIAN, J. A.; GRAY, J. D.; CROFT, J. R.; DACKIS, C. A.; O'BRIEN, C. P. AND CHILDRESS, A. R. (2002). Decreased gray matter concentration in the Insular, Orbitofrontal, Cingulate, and Temporal Cortices of cocaine patients. *Biological Psychiatry*, 51, 134-142.
- FRENCH, S. J. AND TOTTERDELL, S. (2003). Individual nucleus Accumbens-projection neurons receive both basolateral Amygdala and Ventral Subicular afferents in rats. *Neuroscience*, 119 (1):19-31.
- FULWILER, C. E. AND SAPER, C. B. (1984). Subnuclear organization of the efferent connections of the Parabrachial nucleus in the rat. *Brain Research Reviews*, 7, 229-259.



- FUNK, D. AND STEWART, J. (1996). Role of catecholamines in the Frontal cortex in the modulation of basal and stress-induced autonomic output in rats. *Brain Research*, 741, 220-229.
- GABBOTT, P. L. A.; WARNER, T. A.; JAYS, P. R. L. AND BACON, S. J. (2003). Areas and synaptic interconnectivity of Prelimbic (area 32), Infralimbic (area 25) and Insular Cortices in the rat. *Brain Research*, 993, 59-71.
- GALLAGHER, M.; MCMAHAN, R. W. AND SCHOENBAUM, G. (1999). Orbitofrontal cortex and representation of incentive value in associative learning. *Journal of Neuroscience*, 19, 6610-6614.
- GALLISTEL, C. R. (1976). Spatial and temporal summation in the neural circuit subserving brain-stimulation reward. En: Wauquier, A. and Rolls, E. T. (Eds): *Brain Stimulation Reward*, North-Holland Publishing Company.
- GALLISTEL, C. R. AND KARRAS, D. (1984). Pimozide and Amphetamine have Opposing Effects on the Reward Summation Function. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 20, 73-77.
- GALLISTEL, C. R.; LEON, M.; LIM, B. T.; SIM, J. C. AND WARACZYNSKI, M. (1996). Destruction of the Medial Forebrain Bundle caudal to the site of stimulation reduces rewarding efficacy but destruction rostrally does not. *Behavioural Neuroscience*, 110 (4), 766-790.
- GALLO, M.; ARNEDO, M.; AGÜERO, A. AND PUERTO, A. (1988). Electrical intracerebral stimulation of the area Postrema on TAL. *Behavioral Brain Research* 30, 289-296.
- GALLO, M.; ARNEDO, M.; AGÜERO, A. AND PUERTO, A. (1990). The functional relevance of the area Postrema in drug-induced aversion learning. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 35, 543-551.
- GALLO, M.; ARNEDO, M.; AGÜERO, A. AND PUERTO, A. (1991). Participation of the AP in learned aversions induced by body rotation. *Behavioral Brain Research*, 42, 13-23.

- GALLO, M. AND PUERTO (1986). Efectos diferenciales de las lesiones del Área Postrema (AP) durante el aprendizaje interoceptivo (AI) inducido por rotación. *Revista de Psicología General y Aplicada*, 43 (3), pp. 495-502.
- GAMZU, E.; VINCENT, G. AND BOFF, E. (1985). A pharmacological perspective of drugs used in establishing conditioned food aversions. En: *Annals of the New York Academy of Sciences* , vol. 443, pp. 231-249.
- GARAVAN, H.; PANKIEWICZ, J.; BLOOM, A.; CHO, J.-K.; SPERRY, L.; ROSS, T. J.; SALMERON, B. J.; RISINGER, R.; KELLEY, D. AND STEIN, E. A. (2000). Cue-induced cocaine craving: Neuroanatomical specificity for drug users and drug stimuli. *American Journal of Psychiatry*, 157:1789–1798.
- GARCÍA, J. (1990). Learning without memory. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 2 (4), 287-305.
- GARCÍA, J., LASITER, P. A., BERMUDEZ-RATTONI, F. AND DEEMS, D. A. (1985). A general theory of aversion learning. En: *Annals of the New York Academy of Sciences* , vol. 443, pp. 8-21.
- GARCÍA, J.; MCGOWAN, K.; ERVIN, F. AND KOELLING, R. A. (1968). Cues: Their relative effectiveness as a function of the reinforcer. *Science*, 160, 794-795.
- GARCÍA, M. M.; BROWN, H. E. AND HARLAN, R. E. (1995). Alterations in immediate-early gene proteins in the rat forebrain induced by acute morphine injection. *Brain Research*, 692: 23-40.
- GARCÍA PÉREZ, R.; SIMÓN, M. J. AND PUERTO, A. (2002). Condicionamiento de preferencias espaciales inducido por estimulación eléctrica de la Corteza Insular. *II Congreso Nacional de Psicobiología*, Aguadulce-Roquetas de Mar, Almería, España.
- GARRIS, P. A.; KILPATRICK, M.; BUNIN, M. A.; MICHAEL, D.; WALKER, D. AND WIGHTMAN, R. M. (1999). Dissociation of dopamine release in the Nucleus Accumbens from intracranial self-stimulation. *Nature*, 398, 67-69.
- GASTON, K. (1978). Brain mechanisms of conditioned taste aversion learning: A review of the literature. *Physiology Psychology*, 6, 340-353.

- GAURIAU, C. AND BERNARD, J. F. (2002). Pain pathways and Parabrachial circuits in the rat. *Experimental Physiology*, 87 (2), 251-258.
- GAUTIER, J. F.; CHEN, K.; UECKER, A.; BANDY, A.; FROST, J.; SALBE, A. D.; PRATLEY, R. E.; LAWSON, M.; RAVUSSIN, E.; REIMAN, E. M. AND TATARANNI, P. A. (1999). Regions of the human brain affected during a liquid-meal taste perception in the fasting state: a positron emission tomography study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70: 806-810.
- GEORGES, F.; STINUS, L. AND 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 neurones involved. *European Journal of Neuroscience*, 12, 4475-4486.
- GERFEN, C. R. AND CLAVIER R. M. (1978). Neural inputs to the Prefrontal Agranular Insular Cortex in the rat: Horseradish peroxidase study. *Brain Research Bulletin*, 4, 347-353.
- GERRITS, M. A.; LESSCHER, H. B. AND VAN REE, J. M. (2003). Drug dependence and the endogenous opioid system. *European Neuropsychopharmacology*, 13, 424-434.
- GESTREAU, C.; LE GUEN, S. AND 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. *The Journal of Comparative Neurology*, 427, 285-301.
- GHITZA, U. E.; FABBRICATORE, A. T.; PROKOPENKO, V.; PAWLAK, A. P. AND WEST, M. O. (2003). Persistent cue-evoked activity of Accumbens neurons after prolonged abstinence from self-administered cocaine. *The Journal of Neuroscience*, 23 (19), 7239-7245.
- GIEROBA, Z. J. AND BLESSING, W. W. (1994). Fos-Containing neurons in medulla and pons after unilateral stimulation of the afferent abdominal Vagus in conscious rabbits. *Neuroscience*, 59 (4), 851-858.
- GIRAUDO, S. Q.; BILLINGTON, C. J. AND LEVINE, A. S. (1998a). Effects of the opioid antagonists naltrexone on feeding induced by DAMGO in the Central Nucleus of the Amygdala and in the Paraventricular Nucleus in the rat. *Brain Research*, 782, 18-23.

- GIRAUDO, S. Q.; GRACE, M. K.; BILLINGTON, C. J. AND LEVINE, A. S. (1999). Differential effects of neuropeptide Y and the mu-agonist DAMGO on 'palatability' vs. 'energy'. *Brain Research*, 834, 160-163.
- GIRAUDO, S. Q.; KOTZ, C. M.; BILLINGTON, C. J. AND LEVINE, A. S. (1998b). Association between the Amygdala and nucleus of the Solitary Tract in  $\mu$ -opioid induced feeding in the rat. *Brain Research*, 802, 184-188.
- GONG, W.; NEIL, D. AND JUSTICE JR., J. B. (1997). 6-Hydroxydopamine lesion of Ventral Pallidum blocks acquisition of place preference conditioning to cocaine. *Brain Research*, 754, 103-112.
- GORNO-TEMPINI, M. L.; PRADELLI, S.; SERAFÍN, M.; PAGNONI, G.; BARALDI, P.; PORRO, C.; NICOLETTI, R.; HUMITA, C. AND NICHELLI, P. (2001). Explicit and incidental facial expression processing: An fMRI study. *NeuroImage*, 14, 465-473.
- GOSNELL, B. A.; KRAHN, D. D. AND MAJCHZAK, M. J. (1990). The effects of morphine on diet selection are dependent upon baseline diet preferences. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 37, 207-212.
- GOSNELL, B. A. AND LEVINE, A. S. (1996). Stimulation of ingestive behavior by preferential and selective opioid agonists. En: Cooper, S. J. and Clifton, P. G. : *Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior*. Academic Press, pp. 147-166.
- GOSNELL, B. A., MORLEY, J. E. AND LEVINE, A. S. (1986). Opioid-induced feeding: Localization of sensitive brain sites. *Brain Research*, 369, 177-184.
- GOTTFRIED, J. A.; O'DOHERTY, J. AND DOLAN, R. J. (2003). Encoding predictive reward value in human Amygdala and Orbitofrontal Cortex. *Science*, 301, 1104-1107.
- GRACY, K. N.; DANKIEWICZ, L. A.; KOOB, G. (2001). Opiate withdrawal-induce fos immunoreactivity in the rat Extended Amygdala parallels the development of conditioned place aversion. *Neuropsychopharmacology*, 24 (2), 152-160.
- GRANATA, A. R. (1993). Ascending and descending convergent inputs to neurons in the nucleus Parabrachialis of the rat: An intracellular study. *Brain Research*, 600, 315-321.

- GRANT, S.; LONDON, E. D.; NEWLIN, D. B.; VILLEMAGNEN, V. L.; LIU, S.; CONTOREGGI, C.; PHILLIPS, R. L.; KIMES, A. S. AND MARGOLIN, A. (1996). Activation of memory circuits during cue-elicited cocaine craving. *Proceedings National Academy Sciences USA*, 93, 12040-12045.
- GRANT, V. (1987). Do conditioned taste aversions result from activation of emetic mechanism? *Psychopharmacology*, 93, 405-415.
- GRAY, J. A.; YOUNG, A. M. J. AND JOSEPH, M. H. (1997). Dopamine's role. *Science*, 278, letters.
- GRILL, H. J. AND KAPLAN, J. M. (1990). Caudal brainstem participates in the distributed neural control of feeding. En: Stricker, E. M. (Ed.), *Handbook of Behavioral Neurobiology: Neurobiology of Food and Fluid Intake*, Vol. 10, Plenum Press, pp. 125-149.
- GRILL, H. J. AND NORGREN, R. (1978). The taste reactivity test. II. Mimetic responses to gustatory stimuli in chronic thalamic and chronic decerebrate rats. *Brain Research*, 143, 281-297.
- GU, Y.; GONZALEZ, M. F.; CHEN, D. I. AND DEUTSCH, J. A. (1993). Expression of c-Fos in brain subcortical structures in response to nauseant lithium chloride and osmotic pressure in rats. *Neuroscience Letters*, 157, 49-52.
- GUTHMANN, A. AND HERBERT, H. (1999). Distribution of metabotropic glutamate receptors in the Parabrachial and Kölliker-Fuse nuclei of the rat. *Neuroscience*, 89 (3), 1999).
- GUTSTEIN, H. B.; THOME, J. L.; FINE, J. L.; WATSON, S. J. AND AKIL, H. (1998). Pattern of c-Fos mRNA induction in rat brain by acute morphine. *Canadian Journal Physiology and Pharmacology*, 76, 294-303.
- HABER, S. N. AND FUDGE, J. L. (2000). The central nucleus of Amygdala projection to dopamine subpopulations in primates. *Neuroscience*, 97, 479-494.
- HALSELL, C. B. (1992). Organization of Parabrachial nucleus efferents to the Thalamus and Amygdala in the Golden Hamster. *The Journal of Comparative Neurology*, 317, 57-78.

- 
- HALSELL, C. B. AND FRANK, M. E. (1992). Organization of taste-evoked activity in the Hamster Parabrachial Nucleus. *Brain Research*, 572, 286-290.
- HALSELL C. B. AND TRAVERS S. P. (1997). Anterior and posterior oral cavity responsive neurons are differentially distributed among Parabrachial subnuclei in rat. *Journal of Neurophysiology*, 78 (2), 920-938.
- HALSELL, C. B.; TRAVERS, S. P. AND TRAVERS, J. B. (1996). Ascending and descending projections from the rostral nucleus of the Solitary Tract originate from separate neuronal populations. *Neuroscience*, 72 (1): 185-97.
- HAMAMURA, T.; ICHIMARU, Y. AND FIBIGER, H. C. (1997). Amphetamine sensitization enhances regional c-fos expression produce by conditioned fear. *Neuroscience*, 76 (4), 1097-1103.
- HAMILTON, R. B. AND NORNGREN, R. (1984). Central projections of gustatory nerves in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 222 (4), 560-577.
- HAMLIN, A.; BULLER, K. M.; DAY, T. A. AND OSBORNE, P. B. (2001). Peripheral withdrawal recruits distinct central nuclei in morphine-dependent rats. *Neuropharmacology*, 41, 574-581.
- HAN, E. S.; GU, G. B.; SUM, C.Q. AND JU, G. (1991). Convergence of somatosensory and baroreceptive inputs onto Parabrachio-Subfornical organ neurons in the rat: An electrophysiological study. *Brain Research*, 0, 238-249.
- HANAMORI, T. (2005). Posterior Insular Cortex in rats: Response characteristics and function. *Chemical Senses*, 30 (1), 174-175.
- HANAMORI, T.; KUNITAKE, T.; KATO, K. AND KANNAN, H. (1997). Convergence of afferent inputs from the Chorda Tympani-Tonsillar and Pharyngeal Branches of the Glossopharyngeal Nerve, and Superior Laryngeal Nerve on the neurons in the Insular Cortex in rats. *Brain Research*, 763, 267-270.

- HANAMORI, T.; KUNITAKE, T.; KATO, K. AND KANNAN, H. (1998). Neurons in the Posterior Insular Cortex are responsive to gustatory stimulation of the pharyngolarynx, baroreceptor and chemoreceptor stimulation, and tail pinch in rats. *Brain Research*, 785, 97-106.
- HAND, T. AND FRANKLIN, K. B. J. (1985). 6-OHDA lesions of the Ventral Tegmental Area block morphine-induced but not amphetamine-induced facilitation of self-stimulation. *Brain Research*, 328, 233-241.
- HAND, T. H.; KOOB, G. F.; STINUS, L. AND LE MOAL, M. (1988). Aversive properties of opiate receptor blockade: Evidence for exclusively central mediation in naive and morphine-dependent rats. *Brain Research*, 474, 364-368.
- HARRER, M. I. AND TRAVERS, S. P. (1996). Topographic organization of Fos-like immunoreactivity in the rostral nucleus of the Solitary Tract evoked by gustatory stimulation with sucrose and quinine. *Brain Research*, 711 (1-2): 125-137.
- HASSER, E. M.; BISHOP, V. S. AND HAY, M. (1997). Interactions between vasopressin and baroreflex control of the sympathetic nervous system. *Clinical and Experimental Pharmacology Physiology*, 24, 102-108.
- HAWKINS, R. D.; ROLL, P. L.; PUERTO, A. AND YEOMANS, J. S. (1983). Refractory periods of neurons mediating stimulation-elicited eating and brain stimulation reward: Interval scale measurement and tests of a model of neural integration. *Behavioral Neuroscience*, 97 (3): 416-32.
- HAYAKAWA, T.; ZHENG, J. Q. AND SEKI, M. (1999). Direct Parabrachial nuclear projections to the pharyngeal motoneurons in the rat: An anterograde and retrograde double-labeling study. *Brain Research*, 816, 364-374.
- HAYAMA, T.; ITO, S. AND OGAWA, H. (1987). Receptive field properties of the Parabrachio-Thalamic taste and mechanoreceptive neurons in rats. *Experimental Brain Research*, 68 (3), 458-465.
- HAYAMA, T. AND OGAWA, H. (2001). Two loci of the Insular Cortex project to the taste zone of the nucleus of the Solitary Tract in rats. *Neuroscience Letters*, 303, 49-52.

- HAYWARD, L. F. AND FELDER, R. B. (1995). Peripheral chemoreceptor inputs to the Parabrachial Nucleus of the rat. *The American Journal of Physiology*, 268 (3), R707-R714.
- HECHT, M.; KOBER, H.; CLAUS, D.; HILZ, M.; VIETH, J. AND NEUNDÖRFER, B. (1999). The electrical and magnetical cerebral responses evoked by electrical stimulation of the Esophagus and the location of their cerebral sources. *Clinical Neurophysiology*, 110, 1435-1444.
- HEIMER, L. (1995). *The human Brain an Spinal Cord: Functional Neuroanatomy and Dissection Guide*, Second Edition, New York: Springer-Verlag.
- HEIMER, L.; ZAHM D. S.; CHURCHILL, L.; KALIVAS, P. W. AND WOHLTMANN, C. (1991). Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience*, 41 (1): 89-125.
- HERBERT, H. AND BELLINTANI-GUARDIA, B. (1995). Morphology and dendritic domains of neurons in the Lateral Parabrachial Nucleus of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 354, 377-394.
- HERBERT, H. AND FLÜGGE, H. (1995). Distribution OF alpha2-adrenergic binding sites in the Parabrachial complex of the rat. *Anatomy and Embryology*, 192, 507-516.
- HERBERT, H.; MOGA, M. AND SAPER, C. B. (1990). Connections of the Parabrachial Nucleus with the Nucleus of the Solitary Tract and the Medullary Reticular Formation in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 293, 540-580.
- HERMANN, G. E. AND ROGERS, R. C. (1985). Convergence of vagal and gustatory afferent input within the Parabrachial Nucleus of the rat. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 13, 1-17.
- HERMANSON, O. AND BLOMQUIST, A. (1997). Preproenkephalin messenger RNA-expressing neurons in the rat Parabrachial Nucleus: Subnuclear organization and projections to the Intralaminar Thalamus. *Neuroscience*, 81 (3), 803-812.



- HERMANSON, O.; TELKOV, M.; GEIJER, T.; HALLBECK, M. AND BLOMQUIST, A. (1998). Preprodynorphin mRNA-expressing neurones in the rat Parabrachial Nucleus: Subnuclear localization, Hypothalamic projections and colocalization with noxious-evoked fos-like immunoreactivity. *European Journal of Neuroscience*, 10, 358-367.
- HERZ, A. AND SPANAGEL, R. (1995). Endogenous opioids and addiction. En: Tseng, L. F. (Ed.), *The Pharmacology of Opioid Peptides* (pp. 445-462), Harwood Academy Press.
- HETHERINGTON, M. M. (1996). Sensory-specific satiety and its importance in meal termination. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 20 (1): 113-117.
- HIGGS, S.; GILBERT, D. B.; BARNES, N. M. AND COOPER, S. J. (1993). Possible Brainstem mediation of Benzodiazepine-induced hiperfagia. *Appetite*, 21, 183 (abstract).
- HINTON, E. C.; PARKINSON, J. A.; HOLLAND, A. J.; ARANA, F. S.; ROBERTS, A. C. AND OWEN A. M. (2004). Neural contributions to the motivational control of appetite in humans. *European Journal of Neuroscience*, 20, 1411-1418.
- HINTON, E. C.; PARKINSON, J. A.; HOLLAND, A. J.; ARAN, S.; ROBERTS, A. C. AND OWEN, A. M. (2004). Neural contributions to the motivational control of appetite in humans. *European Journal of Neuroscience*, 20, 1411-1418.
- HIROSHIMA, K.; MAEDA, T.; HANADA, K. AND WAKISAKA, S. (2001). Temporal and spatial distribution of Fos protein in the Parabrachial nucleus neurons during experimental tooth movement of the rat molar. *Brain Research*, 908, 161-173.
- HOBBS, D. J.; KOCH, J. E.; AND BORDNAR, R. J. (1994). Naltrexone, dopamine receptor agonist and antagonists, and food intake in rats: 1. Food deprivation. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 49 (1): 197-204.
- HOCHSTENBACH, S. L.; SOLANO-FLORES, L. AND CIRIELLO, J. (1993). Fos induction in brainstem neurons by intravenous hypertonic saline in the conscious rat. *Neuroscience Letters*, 158, 225-228.

- HOEBEL, B. G. (1976). Brain-stimulation reward and aversion in relation to behavior. En: Wauquier, A. and Rolls, E. T. (Eds): *Brain-Stimulation Reward* (Cap 17), North-Holland Publishing Company.
- HOEBEL, B. G. (1997). Neuroscience and appetitive behavior research: 25 years. *Appetite*, 29, 119-133.
- HOEBEL, B. G. AND NOVIN, D. (1982). *The Neural Basis of Feeding and Reward*, Haer Institute for Electrophysiological Research.
- HOLSTEGE, G. (1988). Anatomical evidence for a strong ventral Parabrachial projection to nucleus Raphe magnus and adjacent tegmental field. *Brain Research*, 447, 154-158.
- HORN, C. C. AND FRIEDMAN, M. I. (1998). Methyl palmoxirate increases eating and brain Fos-like immunoreactivity in rats. *Brain Research*, 781, 8-14.
- HUETTEL, S. A. AND McCARTHY, G. (2004). What is odd in the oddball task? Prefrontal cortex is activated by dynamic changes in response strategy. *Neuropsychologia*, 42, 379-386.
- HUNT, G. E. AND MCGREGOR, S. (1998). Rewarding brain stimulation induces only sparse fos-like immunoreactivity in dopaminergic neurons. *Neuroscience*, 83 (2), 501-515.
- HURD, Y. L.; SUZUKI, M. AND SEDVALL, G. C. (2001). D1 and D2 dopamine receptor mRNA expression in whole hemisphere sections of the human brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 22, 127-137.
- HURTADO, M. M.; GARCÍA, R. AND PUERTO, A. (2006). Involvement of dopamine in the aversive processing induced by intracranial electrical stimulation. *Chemical Senses*, 31 (8): E51 (ECRO Abstracts).
- HYDE, R. AND WITHERLY, S. A. (1993). Dynamic contrast: A sensory contribution to palatability. *Appetite*, 21, 1-16.
- HYMAN, S. E. AND MALENKA, R. C. (2001). Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nature Reviews*, 2, 695-703.

- HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C. AND NESTLER, E. J. (2006). Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annual Review of Neuroscience*, 29: 565-98.
- IKEMOTO, S AND PANKSEPP, J. (1999). The role of Nucleus Accumbens dopamine in motivated behavior: A unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Research Reviews*, 31, 6-41.
- INUI, K.; TRAN, T. D.; QIU, Y.; WANG, X.; HOSHIYAMA, M. AND KAKIGI, R. (2003). A comparative magnetoencephalographic study of cortical activations evoked by noxious and innocuous somatosensory stimulations. *Neuroscience*, 120, 235-248.
- ITO, S. (1992). Multiple projections of vagal non-myelinated afferents to the anterior Insular Cortex. *Neuroscience Letters*, 148, 151-154.
- ITO, S. (1994). Electrophysiological evidence for projections of myelinated and non-myelinated primary vagal afferents to the rat Insular Cortex. *Neuroscience Letters*, 179, 29-32.
- ITO, S. (1998). Possible representation of somatic pain in the rat Insular Visceral Sensory Cortex: a field potential study. *Neuroscience Letters*, 241, 171-174.
- IZENWASSER, S.; STALEY, J. K.; COHN, S. AND MASH, D. C. (1999). Characterisation of kappa-opioid receptor binding in human Insular Cortex. *Life Sciences*, 65 (9), 857-862.
- JAEGER, T. V. AND VAN DER KOOY, D. (1993). Morphine acts in the Parabrachial Nucleus, a pontine viscerosensory relay, to produce discriminative stimulus effects. *Psychopharmacology*, 110, 76-84.
- JAEGER, T. V. AND VAN DER KOOY, D. (1996). Separate neural substrates mediate the motivating and discriminative properties of morphine. *Behavioral Neuroscience*, 110 (1), 181-201.
- JASMIN, L.; BURKEY, A. R.; CARD, J. P. AND BASBAUM, A. I. (1997). Transneuronal labeling of a nociceptive pathway, the Spino-(Trigemino)-Parabrachio- Amigdaloid, in the rat. *Journal Neuroscience*, 17 (10), 3751-3765.

- JASMIN, L.; GRANATO, A. AND OHARA, P. T. (2004). Rostral Agranular Insular Cortex and pain areas of the Central Nervous System: A tract tracing study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 468: 425-440.
- JENCK, F.; GRATTON, A. AND WISE, R. A. (1987). Opioid receptor subtypes associated with Ventral Tegmental facilitation of lateral hypothalamic brain stimulation reward. *Brain Research*, 423, 34-38.
- JEROME, C. AND SMITH, G. P. (1984). Development of the drinking deficit to hypertonic saline in rats after abdominal vagotomy. *Physiology and Behavior*, 32, 819-821.
- JIA, H. G., RAO, Z. R. AND 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 Research*, 663, 181-190.
- JIA, H., ZHANG, G. AND WAN, Q. (2005). A GABAergic projection from the central nucleus of the Amygdala to the Parabrachial nucleus: An ultrastructural study of anterograde tracing in combination with post-embedding immunocytochemistry in the rat. *Neuroscience Letters*, 382, 153-157.
- JOHNSON, A. K. AND LOEWY, A. D. (1990). Circunventricular organs and their role in visceral functions. In Loewy, A. D. (Ed.): *Central regulation of autonomic functions*. Oxford: O. U. P., pp. 249-267.
- JOHNSON, S. W. AND NORTH, R. A. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons, *The Journal of Neuroscience*, 12 (2), 483-488.
- JONES, A. K. P.; BROWN, W. D.; FRISTON, K. J.; QI, L. Y. AND FRACKOWIAK, R. S. J. (1991a). Cortical and subcortical localization of response to pain in man using positron emission tomography. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 244: 39-44.

- JONES, A. K. P.; QI, L.Y.; FUJIRAWA, T.; LUTHRA, S. K.; ASHBURNER, J.; BLOOMFIELD, P.; CUNNINGHAM, V.J.; ITOH, M.; FUKUDA, H. AND JONES, T. (1991b) In vivo distribution of opioid receptors in man in relation to the cortical projections of the medial and lateral pain systems measured with positron emission tomography. *Neuroscience Letter* 126: 25-28.
- JONES W. M.; KILPATRICK I. C. AND PHILLIPSON O. T. (1986). The Agranular Insular Cortex: a site of unusually high dopamine utilisation. *Neuroscience Letters*, 72, 330-334.
- KAINU, T.; HONKANIEMI, J.; GUSTAFSSON, J. A.; RECHARDT, L. AND PELTO-HUIKKO, M. (1993). Co-localization of peptide-like immunoreactivities with glucocorticoid receptor- and Fos-like immunoreactivities in the rat Parabrachial Nucleus. *Brain Research*, 615, 245-251.
- KALIA, M. AND MESULAM, M. M. (1980). Brainstem projections of sensory and motor components of the Vagus complex in the cat. I. The cervical Vagus and nodose ganglion. *Journal of Comparative Neurology*, 193, 435-465.
- KALIVAS, P. W. AND NAKAMURA, M. (1999). Neural systems for behavioural activation and reward. *Current Opinion in Neurobiology*, 9, 223-227.
- KANAREK, R. B.; HOMOLESKI, B. A. AND WIART, C. (2000). Intake of a palatable sucrose solution modifies the actions of spiradoline, a Kappa opioid receptor agonist, on analgesia and feeding behavior in male and female rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 65 (1), 97-104.
- KANAREK, R.; PRZYPEK, J.; D'ANCIK, E. AND MARKS-KAUFMAN, R. (1997). Dietary modulation of Mu and Kappa opioid receptor-mediated analgesia. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 58 (1), 43-49.
- KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H. AND JESSELL, T. M. (2000). *Principles of Neural Science*. McGraw Hill (4<sup>th</sup>. Edition).
- KARIMNAMAZI, H.; TRAVERS, S. P. AND TRAVERS, J. B. (2002). Oral and gastric input to the Parabrachial Nucleus of the rat. *Brain Research*, 957, 193-206.

- KATAYAMA, Y.; DEWITT, D. S.; BECKER, D. P. AND HAYES, R. L. (1984). Behavioural evidence for a cholinceptive pontine inhibitory area: Descending control of spinal motor output and sensory input. *Brain Research*, 296, 241-262.
- KAWAI, Y.; TAKAGI, H.; YANAI, K. AND TOHYAMA, M. (1988). Adrenergic projection from the caudal part of the Nucleus of the Tractus Solitarius to the Parabrachial Nucleus in the rat: Immunocytochemical study combined with a retrograde tracing method. *Brain Research*, 459, 369-372.
- KAWASAKI, Y.; JIN, C.; SUEMARU, K.; KAWASAKI, H.; SHIBTA, K. CHOSHI, T.; HIBINO, S.; GOMITA, Y. AND ARAKI, H. (2005). Effects of glutamate receptor antagonists on place aversion induce by naloxone in single-dose morphine-treated rats. *British J. of Pharmacology*, 145, 751-757.
- KELLEY, A. E. (2004). Ventral striatal control of appetitive motivation: Role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27, 765-776.
- KELLEY, A. E.; BAKSHI V. P.; HABER, S. N.; STEININGER, T. L.; WILL, M. J.; ZHANG, M. (2002). Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum. *Physiology and Behavior*, 76, 365-377.
- KELLEY, A. E. AND BERRIDGE, K. C. (2002). The neuroscience of natural rewards: Relevance to addictive drugs. *The Journal of Neuroscience*, 22 (9), 3306-3311.
- KELLEY, A. E.; WILL, M. J.; STEININGER, T. L.; ZANG, M. AND HABER, S. N. (2003). Restricted daily consumption of a highly palatable food (chocolate Ensure) alters striatal enkephalin gene expression. *European Journal of Neuroscience*, 18, 2592-2598.
- KESNER, R. P. AND GILBERT P. E. (2007). The role of the agranular Insular Cortex in anticipation of reward contrast. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88, 82-86.
- KIEFER, S. W. (1985). Neural mediation of conditioned food aversions. En: *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 443, pp. 100-109.
- KIEFER, S. W. AND ORR, M. R., (1992). Taste avoidance, but not aversion, learning in rats lacking gustatory cortex. *Behavioral Neuroscience*, 106 (1), 140-146.

- KILPATRICK, M. R.; ROONEY M. B.; MICHAEL D. J. AND WIGHTMAN R. M. (2000). Extracellular dopamine dynamics in rat caudate-putamen during experimenter-delivered and intracranial self-stimulation. *Neuroscience*, 96 (4) 697–706.
- KILTS, C. D.; GROSS, R. E.; ELY, T. D. AND DREXLER, K. P. G. (2004). The neural correlates of cue-induced craving in cocaine-dependent women. *American Journal of Psychiatry*, 161: 233-241.
- KING, A. B.; MENON R. S.; HACHINSKI, V. AND CECHETTO D. F. (1999). Human forebrain activation by visceral stimuli. *The Journal of Comparative Neurology*, 413: 572-582.
- KINOMURA, S.; KAWASHIMA, R.; YAMADA, K.; ONO, S. S.; ITOH, M.; YOSHIOKA, S.; YAMAGUCHI, T.; MATSUI, H.; MIYAZAWA, H.; ITOH, H.; GOTO, R.; FUJIWARA, T.; SATOH, K. AND FUKUDA, H. (1994). Functional anatomy of taste perception in the human brain studied with positron emission tomography, *Brain Research*, 659, 263-266.
- KIRSCH, P; SCHIENLE, A.; STARK, R.; SAMMER, G.; BLECKER, C.; WALTER, B.; OTT, U.; BURKART, J. AND VAITL, D. (2003). Anticipation of reward in a nonaversive differential conditioning paradigm and the brain reward system: An event-related fMRI study. *NeuroImage*, 20, 1086-1095.
- KNOX, A. P.; STROMINGER, N. L.; BATTLES, A. H. AND CARPENTER, D. O. (1994). The central connections of the Vagus nerve in the ferret. *Brain Research Bulletin*, 33, 49-63.
- KOBASHI, M. AND ADACHI, A. (1986). Projection of nucleus Tractus Solitarius units influenced by hepatoportal afferent signal to Parabrachial nucleus. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 16, 153-158.
- KOBASHI, M. AND BRADLEY, R. M. (1998). Differences in the intrinsic membrane characteristics of Parabrachial nucleus processing gustatory and visceral information, *Brain Research*, 781, 218-226.
- KOBASHI, M.; ICHIKAWA, H.; SUGIMOTO, T. AND ADACHI A. (1993). Response of neurons in the Solitary Tract nucleus, Area Postrema and Lateral Parabrachial Nucleus to gastric load of hypertonic saline. *Neuroscience Letters*, 158, 47-50.

- KOCH, J. E. AND BODNAR, R. J. (1994). Selective alterations in macronutrient intake of food-deprived or glucoprivic rats by centrally-administered opioid receptor subtype antagonists in rats. *Brain Research*, 657, 191-201.
- KOFMAN, O.; MCGLYNN, S. M.; OLMSTEAD, M. C. AND YEOMANS, J. S. (1990). Differential effects of atropine, procaine and dopamine in the rat ventral tegmentum on lateral hypothalamic rewarding brain stimulation. *Behavioural Brain Research*, 38, 55-68.
- KOH, M. T. AND BERNSTEIN, I. L. (2005). Mapping conditioned taste aversion associations using c-Fos reveals a dynamic role for Insular Cortex. *Brain Research*, 785, 97-106.
- KONKLE, A. T. M.; WILSON, P. AND BIELAJEW (1999). Histochemical mapping of the substrate for brain-stimulation reward with glycogen phosphorylase. *Journal of Neuroscience Methods*, 93, 111-119.
- KOOB, G. F. (1992). Drugs of Abuse: Anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends in Pharmacological Sciences*, 13, 177-184.
- KOOB, G. F.; AHMED, S. H.; BOUTREL, B.; CHEN, S. A.; KENNY, P. J.; MARKOU, A.; O'DELL, L. E.; PARSONS, L. H. AND SANNA, P. P. (2004). Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27, 739-749.
- KOOB, G. F. AND LE MOAL, M. (2006). *Neurobiology of addiction*. Academic Press, Elsevier.
- KOOB, G. F.; MARKOU, A.; WEISS, F. AND SCHULTEIS, G. (1993). Opponent process and drug dependence: Neurobiological mechanisms. *Seminars in the Neuroscience*, 5, 351-358.
- KOSAR, E.; HARVEY, J.; GRILL, H.J. AND NORNGREN, R. (1986a). Gustatory cortex in the rat. I. Physiological properties and cytoarchitecture. *Brain Research*, 379, 329-341.
- KOSAR, E.; GRILL, H. J. AND NORNGREN, R. (1986b). Gustatory cortex in the rat. II. Thalamocortical projections. *Brain Research*, 379, 342-352.
- KREEK, M. J. (2001). Drug addictions. En: Quiñones-Jenab, V. (Ed.): *The biological basis of cocaine addiction*, vol. 937, 27-49. Annals of the New York Academy of Sciences.



- KREEK, M. J. AND KOOB, G. F. (1998). Drug dependence: Stress and dysregulation of brain reward pathways. *Drug and Alcohol Dependence*, 51, 23-47.
- KROUT, K. E. AND LOEWI, A. (2000). Parabrachial nucleus projections to midline and intralaminar Thalamic nuclei of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 428, 475-494.
- KRUKOFF, T. L.; HARRIS, K. H. AND JHAMANDAS, J. H. (1993). Efferent projections from the Parabrachial Nucleus demonstrated with the anterograde tracer PHA-L. *Brain Research Bulletin*, 30 (1-2), 163-172.
- KRUKOFF, T. L.; HARRIS, K. H.; LINETSKY, E. AND JHAMANDAS, J. H. (1994). Expression of C-Fos protein in rat brain elicited by electrical and chemical stimulation of the Hypothalamic Paraventricular Nucleus. *Neuroendocrinology*, 59, 590-602.
- KRUKOFF, T. L.; MORTON, T. L.; HARRIS, K. M. AND JHAMANDAS, J. H. (1992). Expression of c-fos protein in rat brain elicited by electrical stimulation of the pontine Parabrachial nucleus. *Journal Neuroscience*, 12 (9): 3582-3590.
- KUBO, T.; HAGIWARA, Y.; SEKIYA, D. AND FUKUMORY, R. (1998). Evidence for involvement of the Lateral Parabrachial Nucleus in mediation of cholinergic inputs to neurons in the rostral ventrolateral medulla. *Brain Research*, 789, 23-31.
- LANÇA, A. J. AND VAN DER KOOY, D. (1985). A Serotonin-containing pathway from the Area Postrema to the Parabrachial Nucleus in the rat. *Neuroscience*, 14 (4), 1117-1126.
- LANE, R. D.; REIMAN, E. M.; BRADLEY, M. M.; LANG, P. J.; AHERN, G. L.; DAVIDSON, R. J. AND SCHWARTZ, G. E. (1997). Neuroanatomical correlates of pleasant and unpleasant emotion. *Neuropsychologia*, 35 (11): 1437-1444.
- LAPEYRE, S.; MAUBORGNE, A.; BECKER, C.; BENOLIEL, J. J.; CESSÉLIN, F.; HAMON, M. AND BOURGOIN, S. (2001). Subcutaneous formalin enhances outflow of Met-enkephalin- and cholecystokinin-like materials in the rat Nucleus Accumbens. *Archives of Pharmacology*, 363, 399-406.

- LASITER, P. S. (1982). Cortical substrates of taste aversion learning. Direct amigdalocortical projections to the gustatory neocortex do not mediate conditioned taste aversions learning. *Physiology Psychology*, 10 (4), 377-383.
- LASITER, P. S. (1985). Thalamocortical relations in taste aversion learning: II. Involvement of the Medial Ventrobasal Thalamic Complex in taste aversion learning. *Behavioural Neuroscience*, 99 (3), 477-495.
- LASITER, P. S.; DEEMS, D. A. AND GLANZMAN, D. L. (1985). Thalamocortical relations in taste aversion learning: I. Involvement of gustatory thalamocortical projections in taste aversion learning. *Behavioural Neuroscience*, 99(3), 454-476.
- LASITER, P. AND GLANZMAND, D. L. (1982). Cortical substrates of taste aversion learning: dorsal Prepiriform (Insular) lesions disrupt taste aversion learning. *Journal of Comparative and Physiology Psychology*, 96(3), 376-392.
- LASITER, P.; AND GLANZMAND, D. L. (1985). Cortical substrates of taste aversion learning: Involvement of dorsolateral amigdaloid nuclei and temporal neocortex in taste aversion learning. *Behavioural Neuroscience*, 99 (2) 257-276.
- LAVIOLETTE, S. R.; NADER, K. AND VAN DER KOOY, D. (2002). Motivational state determines the functional role of the mesolimbic dopamine system in the mediation of opiate reward processes. *Behavioural Brain Research*, 129, 17-29.
- LE GUEN, S.; GESTREAU, C. AND 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. *European Journal of Neuroscience*, 17, 2425-2437.
- LE MAGNEN, J. (1990). A role for opiates in food reward and food addiction. En Capaldi, E. D. and Powley, T. L.: *Taste experience and Feeding*. American Psychological Association.
- LE MAGNEN, J. (1992). *Neurobiology of feeding and nutrition* , Academic Press.
- LE MAGNEN, J. (1999). The state of research into the mechanisms of appetites for energy. *Appetite*, 33, 2-7.

- LE MAGNEN, J.; MARFAING-JALLAT, P.; MICELI, D. Y DEVOS, M. (1980). Pain modulating and reward systems: A single brain mechanism? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 12, 729-733.
- LEIBOWITZ, S. F. (1982). Hypothalamic catecholamine systems in relation to control of eating behavior and mechanisms of reward. En: Hoebel, B. G. and Novin, D. (Eds.): *The Neural Basis of Feeding and Reward*, Haer Institute for Electrophysiological Research, pp. 241-258.
- LENZ, F. A.; GRACELY, R. H.; ZIRH, T. A.; LEOPOLD, D. A.; ROWLAND, L. H. AND DOUGHERTY, P. M. (1997). Human thalamic nucleus mediating taste and multiple other sensations related to ingestive behavior. *Journal of Neurophysiology*, 77 (6): 3406-3409.
- LEPORE, M. AND FRANKLIN, K. B. J. (1996). N-Methyl-D-Aspartate lesions of the Pedunculopontine Nucleus block acquisition and impair maintenance of responding reinforced with brain stimulation. *Neuroscience*, 71(1), 147-155.
- LEPPÄ, M.; KORVENOJA, A.; CARLSON, S.; TIMONEN, P.; MARTINKAUPPI, S.; AHONEN, J.; ROSENBERG, P. H.; ARONEN, H. J. AND KALSO, E. (2006). Acute opioid effects on human brain as revealed by functional magnetic resonance imaging. *NeuroImage*, 31 (2): 661-669.
- LESLIE, R. A.; REYNOLDS, J. M. AND LAWES, I. N. C. (1992). Central connections of the nuclei of the Vagus nerve. In Ritter, R. C. and Barnes, C. D. (Eds.): *Neuroanatomy and Physiology of Abdominal Vagal Afferents*. Boca Raton: CRC Press, pp. 81-98.
- LEVENTHAL, L. AND BODNAR, R. J. (1996). Different central opioid receptor subtype antagonists modify maltose dextrin and deprivation-induced water intake in sham feeding and sham drinking rats. *Brain Research*, 741, 300-308.
- LEVINE, A. S. AND BILLINGTON, C. J. (1997). Why do we eat? A neural systems approach. *Annual Review of Nutrition*, 17, 597-619.
- LEVINE, A. S. M.; WELDON, D. T.; GRACE, M.; CLEARY, J. P. AND BILLINGTON, C. J. (1995). Naloxone blocks that portion of feeding driven by sweet taste in food-restricted rats. *American Journal of Physiology*, 268 (37): R248-R252.

- LI, B. H. AND ROWLAND, N. E. (1993). Dexfenfluramine induces Fos-like immunoreactivity in discrete brain regions in rats. *Brain Research Bulletin*, 31, 43-48.
- LI, B. H. AND ROWLAND, N. E. (1995). Effects of vagotomy on cholecystokinin- and dexfenfluramine-induced Fos-like immunoreactivity in the rat brain. *Brain Research Bulletin*, 37 (6), 589-593.
- LI, B. H.; SPECTOR, A. C. AND ROWLAND, N. E. (1994). Reversal of dexfenfluramine-induced anorexia and C-Fos/ C-Jun expression by lesion in the Lateral Parabrachial nucleus. *Brain Research*, 640, 255-267.
- LI, C. S.; DAVIS, B. J. AND SMITH D. V. (2003). Opioid modulation of taste in the Nucleus of the Solitary Tract. *Brain Research*, 965, 21-34.
- LIAO, R.-M.; CHANG, Y.-H.; WANG, S.-H. AND LAN, C.-H. (2000). Distinct accumbal subareas are involved in place conditioning of amphetamine and cocaine. *Life Sciences*, 67, 2033-2043.
- LIEBLICH, I.; YIRMIYA, R. AND LIEBESKIND (1991). Intake of and preference for sweet solutions are attenuated in morphine-withdrawn rats. *Behavioural Neuroscience*, 105 (6), 965-970.
- LIEBMAN, J. M. (1989). Introduction. En: Liebman, J. M. y Cooper, S. J. *The Neuropharmacological Basis of Reward*, Oxford University Press, Cap 1, pp 1-13.
- LIGHT, A. R.; SEDIVÉC, M. J.; CASALE, E. J. AND JONES, S. L. (1993). Physiological and morphological characteristics of spinal neurons projecting to the Parabrachial region of the cat. *Somatosensory and Motor Research*, 10 (3), 309-325.
- LIOTTI, M.; MAYBERG, H. S.; BRANNAN, S. K.; MCGINNIS, S.; JERABEK, P. AND FOX, P. T. (2000). Differential limbic-cortical correlates of sadness and anxiety in healthy subjects: Implications for affective disorders. *Biological Psychiatry*, 48: 30-42.
- LIU, N.; ROCKHOLD, R. W. AND HO, I. K. (1999). Electrical stimulation of nucleus Paragigantocellularis induces opioid withdrawal-like behaviors in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 62 (2): 263-71.

- LOEWY, A. D. (1990b). Central Autonomic pathways. In: Loewy, A. D. (Ed.): *Central Regulation of Autonomic Functions*. Oxford: O. U. P., pp. 88-103.
- LOEWY, A. D. AND BURTON, H. (1978). Nuclei of the Solitary Tract: Efferent connections to the lower Brainstem and Spinal Cord of the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 181, 421-450.
- LOUILOT, A. AND BESSON, C. (2000). Specificity of Amygdalostriatal interactions in the involvement of mesencephalic dopaminergic neurons in affective perception. *Neuroscience*, 96 (1), 73-82.
- LOWE, A. S.; WILLIAMS, S. C. R.; SYMMS, M. R.; STOLERMAN, I. P. AND SHOAB, M. (2002). Functional magnetic resonance neuroimaging of drug dependence: Naloxone-precipitated morphine withdrawal. *NeuroImage*, 17, 902-910.
- LUTZ, T. A.; SENN, M.; ALTHAUS, J.; DEL PRETE, E.; EHRENSPERGER, F. AND SCHARRER, E. (1998b). Lesion of the area Postrema/ nucleus of the Solitary Tract (AP/ NTS) attenuates the anorectic effects of amylin and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in rats. *Peptides*, 21, 233-238.
- LYNCH, W. C. (1986). Opiate Blockade Inhibits Saccharin Intake and Blocks Normal Preference Acquisition. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 24, 833-836.
- LYOO, I. K.; POLLACK, M. H.; SILVERI, M. M.; AHN, K. H.; DIAZ, C. I.; HWANG, J.; KIM, S. J.; YURGELUN-TODD, D. A.; KAUFMAN, M. J. AND RENSHAW, P. F. (2006). Prefrontal and temporal gray matter density decreases in opiate dependence. *Psychopharmacology*, 184, 139-144.
- MACKEY, B.; KELLER, J. AND VAN DER KOOY, D. (1986). Visceral cortex lesions block conditioned taste aversions induced by morphine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 24, 71-78.
- MACKEY, W. B. AND VAN DER KOOY, D. (1985). Neuroleptics block the positive reinforcing effects of amphetamine but not of morphine as measure by place conditioning. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 22, 101-105.

- MALDONADO, R. (2002). Study of cannabinoid dependence in animals. *Pharmacology and Therapeutics*, 95, 153-164.
- MALDONADO, R.; SAIARDI, A.; VALVERDE, O.; SAMAD, T. A.; ROQUES, B. P. AND BORRELI, E. (1997). Absence of Opiate Rewarding Effects in Mice Lacking Dopamine D2 Receptors. *Nature*, 388, 586-589.
- MALEY, B. E. AND PANNETON, W. M. (1988). Enkephalin-immunoreactive neurons in the Nucleus Tractus Solitarius project to the Parabrachial Nucleus of the cat. *Brain Research*, 442, 340-344.
- MANSOUR, A.; FOX, C. A.; AKIL, H. AND WATSON, S. J. (1995). Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: Anatomical and functional implications. *Trends in Neuroscience*, 18 (1), 22-29.
- MANSOUR, A.; FOX, C. A.; THOMPSON, R. C.; AKIL H. AND WATSON, S. J. (1994).  $\mu$ -Opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: comparison to  $\mu$ -receptor binding. *Brain Research* 643, 245-265.
- MANSOUR, A.; KHACHATURIAN, H.; LEWIS, M. E.; AKIL, H. AND WATSON, S. J. (1988). Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends in Neuroscience*, 11 (7), 308-314.
- MANZANEDO, C.; AGUILAR, M. A.; RODRIGUEZ-ARIAS, M. AND MIÑARRO J. (2001). Effects of dopamine antagonists with different receptor blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice. *Behavioural Brain Research*, 121, 189-197.
- MAO, J. (1999). NMDA and opioid receptors: Their interactions in antinociception, tolerance and neuroplasticity. *Brain Research Reviews*, 30, 289-304.
- MARK, G. P.; SMITH, S. E.; RADA, P. V. AND HOEBEL, B. G. (1994). An appetitively conditioned taste elicits a preferential increase in mesolimbic dopamine release. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 48 (3), 651-660.
- MARKS-KAUFFMAN, R. AND KANAREK, R. B. (1990). Dietary modulation of the anorectic potency of amphetamine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 35 (2), 301-306.

- MARTIN, J. R.; WHITE, B. D.; AND HULSEY, M. G. (1991). The regulation of body weight. *American Scientist*, 79, 528-541.
- MASH, D. C.; STALEY, J. K.; IZENWASSER, S.; BASILE, M. AND RUTTENBER, A. J. (2000). Serotonin transporters upregulate with chronic cocaine use. *The Journal of Chemical Neuroanatomy*, 20, 271-280.
- MATHEW, R. J.; WILSON, W. H.; COLEMAN, R. E.; TYRKINGTON, T. G. AND DEGRADO, T. R. (1997). Marijuana intoxication and brain activation in marijuana smokers. *Life Sciences*, 60 (23), 2075-2089.
- McBRIDE, W. J.; MURHY, J. M. AND IKEMOTO, S. (1999). Localization of brain reinforcement mechanisms: Intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behavioural Brain Research*, 101, 129-152.
- McDONALD, A. J. (1998). Cortical pathways to the mammalian Amygdala. *Progress in Neurobiology*, 55, 257-332.
- McDONALD, A. J. AND JACKSON, T. R. (1987). Amygdaloid connections with posterior Insular and Temporal Cortical areas in the Temporal Cortical areas in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 262, 59-77.
- McDONALD, A. J.; MASCAGNI, F. AND GUO L. (1996). A projections of the medial and lateral Prefrontal Cortices to the Amygdala: Phaseolus Vulgaris Leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience*, 71 (1), 55-75.
- McDONALD, R. V.; PARKER, L. A. AND SIEGEL, S. (1997). Conditioned sucrose aversions produced by naloxone-precipitated withdrawal from acutely administered morphine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 58 (4):1003-8.
- McFARLAND, K. AND ETTEMBERG, A. (1998). Naloxone blocks reinforcement but not motivation in an operant runway model of heroin-seeking behavior. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 6 (4), 353-359.

- McFARLAND, K. AND ETTENBERG, A. (1999). Haloperidol does not attenuate conditioned place preferences or locomotor activation produced by food- or heroin-predictive discriminative cues. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 62 (4): 631-641.
- McGREGOR, I. S. AND ATRENS, D. M. (1991). Prefrontal cortex self-stimulation and energy balance. *Behavioural Neuroscience*, 105 (6), 870-883.
- MEDIAVILLA, C. (1995). *El cerebelo y circuitos asociados en aprendizaje aversivo gustativo*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- MEDIAVILLA, C.; CUBERO, I.; MOLINA, F. AND PUERTO, A. (2001b). Aversiones gustativo-nutritivas desarrolladas en situaciones experimentales y clínicas: Características y Mecanismos Biológicos Implicados. *Psiquis*, 22 (4), 195-204.
- MEDIAVILLA, C.; MOLINA, F. AND PUERTO, A. (1998). Bilateral lesions in the cerebellar interpositus-dentate region impair taste aversion learning in rats. *Physiology and Behavior*, 65, 25-33.
- MEDIAVILLA, C.; MOLINA, F. AND PUERTO, A. (1999). Inferior Olive lesions impair concurrent taste aversion learning in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 72, 13-27.
- MEDIAVILLA, C.; MOLINA, F. AND 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. AND PUERTO, A. (2001a). Effects of a flavor-placement reversal test after different modalities of taste aversion learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 76, 209-224.
- MEDIAVILLA, C.; MOLINA, F. AND PUERTO, A. (2005). Concurrent conditioned taste aversion: A learning mechanism based on rapid neural versus flexible humoral processing of visceral noxious substances. *Neuroscience and BioBehavioural Reviews*, 29, 1107-1118.
- MEI, N. (1983). Recent studies on intestinal vagal afferent innervation. Functional implications. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 9, 199-206.



- MELCHIOR, J. C.; RIGAUD, D.; CHAYVIALLE, J. A.; COLAS-LINHART, N.; LAFOREST, M. D.; PETIET, A.; COMOY, E. AND APFELBAUM, M. (1994). Palatability of a meal influences release of Beta- Endorphin, and of potential regulators of food intake in healthy human subjects. *Appetite*, 22, 233-244.
- MERCER, M. E. AND HOLDER, M. D. (1997). Food cravings, endogenous opioid peptides, and food intake: A review. *Appetite*, 29, 325-352.
- MICELI, M.; POST, C. AND VAN DER KOOY, D. (1987). Catecholamine and serotonin colocalization in projecting neurons of the area Postrema. *Brain Research*, 412, 381-385.
- MIGITA, K.; LOEWY, A. D.; RAMABHADRAN, T. V.; KRAUSE, J. E. AND WATERS, S. M. (2001). Immunohistochemical localization of the neuropeptide Y Y1 receptor in rat Central Nervous System. *Brain Research*, 889, 23-37.
- MILIARESSIS, E. AND MALETTE, J. (1987). Summation and saturation properties in the rewarding effect of brain stimulation. *Physiology and Behavior*, 41, 595-604.
- MILIARESSIS, E.; ROMPRE, P.P.; LAVIOLETTE, L. P.; PHILIPPE, L. AND COULOMBE, D. (1986). The curve-shift paradigm in self-stimulation. *Physiology and Behavior*, 37, 85-91.
- MILLAN, M. J. (2002). Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, 66, 355-474.
- MILNER, T. A.; JOHN, T. H.; MILLER, R. J. AND PICKEL, V. M. (1984). Substance P, neurotensin, enkephalin, and catecholamine-synthesizing enzymes: Light microscopic localizations compared with autoradiographic label in solitary efferents to the rat Parabrachial region. *The Journal of Comparative Neurology*, 226 (3), 434-437.
- MILNER, T. A.; JOHN, T. H. AND PICKEL, V. M. (1986). Tyrosine hydroxylase in the rat Parabrachial region: Ultrastructural localization and extrinsic sources of immunoreactivity. *The Journal of Neuroscience*, 6 (9), 2585-2603.
- MIRANDA, M. I.; FERREIRA, G.; RAMIREZ-LUGO, L. AND BERMÚDEZ-RATTONI, F. (2003). Role of cholinergic system on the construction of memories: Taste memory encoding. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80, 211-222.

- MIRANDA, M. I.; RAMIREZ-LUGO, L. AND BERMÚDEZ-RATTONI, F. (2000). Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Research*, 882, 230-235.
- MITCHELL, J. L.; SILVERMAN, M. B. AND AICHER, S. A. (2004). Rat trigeminal lamina I neurons that project to thalamic or Parabrachial nuclei contain the  $\mu$ -opioid receptor. *Neuroscience*, 128, 571-582.
- MITCHELL, J. M.; BASBAUM, A. I. AND FIELDS, H. L. (2000). A locus and mechanism of action for associative morphine tolerance. *Nature Neuroscience*, 3 (1), 47-51.
- MOGA, M. M.; HERBERT, H.; HURLEY, K. M.; YASUI, Y.; GRAY, T. S. AND SAPER, C. B. (1990). Organization of cortical, basal forebrain, and hypothalamic afferents to the Parabrachial Nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 295, 624-661.
- MOLINA, F. AND PUERTO, A. (1981). El condicionamiento aversivo gustativo como modelo especializado de aprendizaje. En: Tudela, P., *Psicología Experimental*, UNED, pp.263-280.
- MOLINA, F. AND PUERTO, A. (1986). Los interoceptores viscerales en la regulación nutritiva a corto plazo: Fase cefálica, distensión y vaciado gástrico. *Revista de Psicología General y Aplicada*, 41 (4): 677-685.
- MOLINA, F. AND PUERTO, A. (1990). Bases biológicas de la Motivación y la Emoción. En: Mayor, J. y Pinillos, J. L., *Tratado de Psicología General*, Alhambra Univ., pp. 47-78.
- MONROE, S. AND 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.
- MOUFID-BELLANCOURT, S.; RAZAFIMANALINA, R. AND 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 neurons. *Behavioural Pharmacology*, 7, 798-809.
- MOUFID-BELLANCOURT, S. AND VELLELY, L. (1994). Effects of morphine injection into the Parabrachial area on saccharin preference: Modulation by Lateral Hypothalamic neurons. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 48 (1), 127-133.

- 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 Research*, 418, 214-220.
- MUCHA, R. F. AND HERZ, A. (1985). Motivational properties of kappa and mu opioid receptor agonists studied with place and taste preference conditioning. *Psychopharmacology*, 86, 274-280.
- MUCHA, R. F.; VAN DER KOOY, D.; O'SHAUGHNESSY, M. AND BUCENIEKS, P. (1982). Drug reinforcement studied by the use of place conditioning in rat. *Brain Research*, 243, 91-105.
- MUELLER, D.; PERDIKARIS, D. AND STEWART, J. (2002). Persistence and drug-induced reinstatement of a morphine-induced conditioned place preference. *Behavioural Brain Research*, 136, 389-397.
- MUELLER, D. AND STEWART, J. (2000). Cocaine-induced conditioned place preference: Reinstatement by priming injections of cocaine after extinction. *Behavioural Brain Research*, 115, 39-47.
- MUSEO, E. AND WISE, R. A. (1994). Place preference conditioning with Ventral Tegmental injections of Cytisine. *Life Sciences*, 55 (15), 1179-1186.
- NADEL, L. (1992). Multiple memory systems: What and why. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 4, 179-188.
- NADER, K.; BECHARA, A. AND 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. *Behavioural Neuroscience*, 110 (6), 1496-1502.
- NADER, K.; BECHARA, A. AND VAN DER KOOY, D. (1997). Neurobiological constraints on behavioural models of motivation. *Annual Reviews of Psychology*, 48, 85-114.

- NADER, K. AND 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.
- NAGAI, K.; INO, H.; YAMAMOTO, H.; NAKAGAWA, H.; YAMANO, M.; TOHYAMA, M.; SHIOSAKA, S.; SHIOTANI, Y. AND INAGAKI, S. (1987). Lesions in the Lateral part of the Dorsal Parabrachial Nucleus caused hyperphagia and obesity. *Journal Clinical Biochemistry Nutrition*, 3, 103-112.
- NAKAHARA, D.; ISHIDA, Y.; NAKAMURA, M.; FURUNO, N. AND NISHIMORI, T. (2001). Intracranial Self-Stimulation induces Fos expression in gabaergic neurons in the rat Mesopontine Tegmentum. *Neuroscience*, 106 (3), 633-641.
- NAKAJIMA, N.; LIU, X. AND LAU, C. L. (1993). Synergistic interaction of D1 and D2 dopamine receptors in the reinforcing effect of brain stimulation. *BioBehavioural Neuroscience*, 107 (1), 161-165.
- NAKASHIMA, M.; UEMURA, M.; YASUI, K.; OZAKI, H. S.; TABATA, S. AND TAEN, A. (2000). An anterograde and retrograde tract-tracing study on the projections from the thalamic gustatory area in the rat: distribution of neurons projecting to the Insular Cortex and Amygdaloid Complex. *Neuroscience Research*, 36, 297-309.
- NAOR, C. AND DUDAI, Y. (1996). Transient impairment of cholinergic function in the rat Insular Cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behavioural Brain Research*, 79 (1-2), 61-67.
- NAQVI, N. H.; RUDRAUF, D.; DAMASIO, H. AND BECHARA, A. (2007). Damage to the Insula disrupts addiction to cigarette smoking. *Science*, 315 (5811): 531 – 534.
- NARITA, M.; FUNADA, M. AND SUZUKI, T. (2001). Regulations of opioid dependence by opioid receptor types. *Pharmacology and Therapeutics*, 89, 1-15.
- NAUTA, W. J. H. AND FEIRTAG, M. (1987). *Fundamentos de Neuroanatomía*. Labor.

- NEAL, C. R.; MANSOUR, A.; REINSCHIED, R.; NOTHACKER, H.-P.; CIVELLI, O. AND WATSON, S. J. (1999). Localization of orphanin FQ (Nociceptin) peptide and messenger RNA in the central nervous system of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 406: 503-547.
- NEAL, C. R.; OWENS, C. E.; TAYLOR, L. P.; HOVERSTEN, M. T.; AKIL, H. AND WATSON JR. S. J. (2003). Binding and GTP $\gamma$ S autoradiographic analysis of preproorphanin precursor peptide products at the ORL1 and opioid receptors. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 25, 233-247.
- NÉGYESSY, L.; HÁMORI, J. AND BENTIVOGLIO, M. (1998). Contralateral cortical projection to the Mediodorsal Thalamic nucleus: Origin and synaptic organization in the rat. *Neuroscience*, 84 (3), 741- 753.
- NENCINI, P. (1996). Sensitization to the ingestive effects of opioids. En: Cooper, S. J. and Clifton, P. G.: *Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior*. Academic Press, pp. 193-218.
- NERAD, L.; RAMÍREZ-AMAYA, V.; ORMSBY, C. E.; BERMÚDEZ-RATTONI, F. (1996). Differential effects of anterior and posterior Insular Cortex lesions on the acquisition of conditioned taste aversion and spatial learning. *Neurobiology Learning and Memory*, 66 (1): 44-50.
- NESTLER, E. J. (2001). Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature Reviews*, 2, 119-128.
- NISHIJO, H. AND NORGREN, R. (1990). Responses from Parabrachial gustatory neurons in behaving rats. *Journal of Neurophysiology*, 63, 707-724.
- NISHIJO, H. AND NORGREN, R. (1997). Parabrachial neural coding of taste stimuli in awake rats. *Journal of Neurophysiology*, 78 (5), 2254-2268.
- NORGREN, R. (1983). Afferent interactions of cranial nerves involved in ingestion. *Journal of Autonomic Nervous System*, 9, 67-77.

- NORGREN, R. (1984). Taste: Central mechanisms. En Darien-Smith I. (Eds.). *Handbook of Physiology: The Nervous System III: Sensory process*. American Physiological Society, 1087-1128.
- NORGREN, R. (1985). Taste and the autonomic nervous system. *Chemical senses*, 19 (2), 143-161.
- NORGREN, R. (1990). Gustatory System. En: Paxinos, G.: *The human nervous system*, Academic Press. pp. 845-861.
- NORGREN, R. (1995). Gustatory System. En: Paxinos, G.: *The rat nervous system, Second Edition*. Academic Press. pp. 751-767.
- NORGREN, R. AND LEONARD, C. M. (1971). Taste pathways in rat brainstem. *Science*, 173, 1136-1139.
- NORGREN, R. AND PFAFFMANN, C. (1975). The pontine taste area in the rat. *Brain Research*, 91, 99-117.
- NOVIN, D. (1988). Gustatory and visceral modulation of feeding. En: Morley, J.E.; Serman, M. B. and Walsh, J. H. (Eds.): *Nutritional modulation of neural function*. Academic Press.
- NOVIN, D.; ROGERS, R. C. AND HERRMAN, G. (1981). Visceral afferent and efferent connections in the brain. *Diabetologia*, 20, 331-336.
- O'DOHERTY, J.; CRITCHLEY, H.; DEICHMANN, R. AND DOLAN, R. J. (2003). Dissociating valence of outcome from behavioural control in human orbital and ventral prefrontal cortices. *The Journal of Neuroscience*, 23 (21): 7931-7939.
- O'DOHERTY, J. O.; KRINGELBACH, M. L.; ROLLS, E. T.; HORNAK, J. AND ANDREWS, C. (2001). Abstract reward and punishment representations in the human Orbitofrontal cortex. *Nature Neuroscience*, 4 (1), 95-102.
- O'DOHERTY, J. P. (2004). Reward representations and reward-related learning in the human brain: Insights from neuroimaging. *Current Opinion in Neurobiology*, 14, 769-776.

- O'LEARY, D. S.; BLOCK, R. I.; KOEPPER, J. A.; FLAUM, M.; SCHULTZ, S. K.; ANDREASEN, N. C.; PONTO, L. B.; WATKINS, G. L.; HURTIG, R. R. AND HICHTWA, R. D. (2002). Effects of smoking marijuana on brain perfusion and cognition. *Neuropsychopharmacology*, 26 (6), 802-816.
- OGAWA, H.; ITO, S.; MURAYAMA, N. AND HASEGAWA, K. (1990). Taste area in granular and dysgranular Insular Cortices in the rat identified by stimulation of entire oral cavity. *Neuroscience Research*, 9, 196-201.
- OGAWA, H.; IMOTO, T. AND HAYAMA, T. (1984). Responsiveness of Solitario-Parabrachial relay neurons to taste mechanical stimulation applied to oral cavity in rats. *Experimental Brain Research*, 54, 349-358.
- OGAWA, H.; MURAYAMA, N. AND HASEGAWA, K. (1992). Difference in receptive field features of taste neurons in rat granular and dysgranular Insular Cortices. *Experimental Brain Research*, 91, 408-414.
- OGAWA, H. AND WANG, X. D. (2002). Neurons in the cortical taste area receive nociceptive inputs from the whole body as well as the oral cavity in the rat. *Neuroscience Letters*, 322, 87-90.
- OLDS, J. AND 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. AND FORBES, J. J. (1981). The central basis of motivation: Intracranial self-stimulation studies. *Annual Reviews of Psychology*, 32, 523-574.
- OLMSTEAD, M. C. AND FRANKLIN, B. J. (1997). The development of a conditioned place preference to morphine: Effects of lesions of various CNS sites. *Behavioral Neuroscience*, 111 (6), 1313-1323.
- OLMSTEAD, M. C. AND FRANKLIN, B. J. (1997b). The development of a conditioned place preference to morphine: Effects of microinjections into various CNS sites. *Behavioral Neuroscience*, 111 (6), 1324-1334.

- OLMSTEAD, M. C. AND FRANKLIN, K. B. J. (1993). Effects of Pedunculopontine Tegmental Nucleus lesions on morphine-induced conditioned place preference and analgesia in the formalin test. *Neuroscience*, 57 (2), 411-418.
- OLMSTEAD, M. C. AND FRANKLIN, K. B. J. (1994). Lesions of the Pedunculopontine Tegmental Nucleus block drug-induced reinforcement but not amphetamine-induced locomotion. *Brain Research*, 638, 29-35.
- ÖNGÜR, D.; AN, X. AND PRICE, J. L. (1998). Prefrontal cortical projections to the Hypothalamus in macaque monkeys. *The Journal of Comparative Neurology*, 401, 480-505.
- OTAKE, K. AND NAKAMURA, Y. (2003). Forebrain neurons with collateral projections to both the Interstitial nucleus of the posterior limb of the Anterior Commissure and the nucleus of the Solitary Tract in the rat. *Neuroscience*, 119 (3): 623-628.
- PALCHAUDHURI, M. AND FLÜGE, G. (2005). 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression in pyramidal neurons of cortical and limbic brain regions. *Cell Tissue Research*, 321, 159-172.
- PAMMER, C.; FODOR, M. AND PALKOVITS, M. (1988). Localization of corticotropin-releasing factor, somatostatin, and vasoactive intestinal polypeptide in the Parabrachial nuclei of the human brain. *Journal of Neuroscience Research*, 20 (1), 109-114.
- PAN, Z. Z. (1998). Mu-opposing actions of the kappa-opioid receptor. *Trends Pharmacology Sciences*, 19 (3); 94-98.
- PAPADOUKA, V. AND CARR, K. D. (1994). The role of multiple opioid receptors in the maintenance of stimulation-induced feeding. *Brain Research*, 639, 42-48.
- PAPAS, S. AND FERGUSON, A. V. (1990). Electrophysiological characterization of reciprocal connections between the Parabrachial nucleus and the Area Postrema in the rat. *Brain Research Bulletin*, 24, 577-582.
- PAPP, M.; GRUCA, P. AND WILLNER, P. (2002). Selective blockade of drug-induced place preference conditioning by ACPC, a functional NMDA-receptor antagonist. *Neuropsychopharmacology*, 27 (5): 727-743.



- PAREDES, R. G.; MUZZI, G.; AGUIRRE, E. AND ROMERO, V. (2000). Can a generalised kindling seizure induce a reward state? *Epilepsy Research*, 38, 249-257.
- PARKER, L.; FAILOR, A. AND WEIDMAN, K. (1973). Conditioned preferences in the rat with an unnatural need state: Morphine withdrawal. *Journal of Comparative and Physiology Psychology*, 82 (2), 294-300.
- PARKER, L. A. (1991). Taste reactivity responses elicited by reinforcing drugs: A dose-response analysis. *Behavioural Neuroscience*, 103 (6), 955-964.
- PARKER, L. A. AND CARVELL, T. (1986). Orofacial and somatic responses elicited by Lithium-, Nicotine-, and Amphetamine-paired sucrose solution. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 24, 883-887.
- PARKER, L. A.; CYR, J. A.; SANTI, A. N. AND BURTON, P. D. (2002). The aversive properties of acute morphine dependence persist 48 h after a single exposure to morphine. Evaluation by taste and place conditioning. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 72, 87-92.
- PARKER, L. A.; MAIER, S.; RENNIE, M. AND CREBOLDER, J. (1992). Morphine- and naltrexone- induced modification of palatability: Analysis by the taste reactivity test. *Behavioural Neuroscience*, 106 (6), 999-1010.
- PATON, J. F. R.; LI, Y.-W.; DEUCHARS, J. AND KASPAROV, S. (2000). Properties of Solitary Tract neurons receiving inputs from the sub-diaphragmatic Vagus Nerve. *Neuroscience*, 95 (1): 141-153.
- PAXINOS, G. (1995). *The Rat Nervous System, Second edition*, Academic Press.
- PAXINOS, G. AND WATSON, C. (1996). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, (Compact Third Edition) San Diego, CA. Academic Press.
- PECIÑA, S. AND BERRIDGE, K. C. (2000). Opioid site in Nucleus Accumbens Shell mediates eating and hedonic 'liking' for food: map based on microinjection Fos plumes. *Brain Research*, 863, 71-86.

- PELCHAT, M. L. (2002). Of human bondage: food craving, obsession, compulsion, and addiction. *Physiology and Behavior*, 76 (3): 347-52.
- PELCHAT, M. L.; JOHNSON, A.; CHAN, R.; VALDEZ, J. AND RAGLAND, D. (2004). Images of desire: food-craving activation during fMRI. *NeuroImage*, 23, 1486-1493.
- PEREZ, C.; LUCAS, F. AND SCLAFANI, A. (1998). Increased flavor acceptance and preference conditioned by the postingestive actions of glucose. *Physiology and Behavior*, 64 (4), 483-492.
- PERKS, S. M. AND CLIFTON, P. G. (1997). Reinforcer revaluation and conditioned place preference. *Physiology and Behavior*, 61 (1), 1-5.
- PETRI, H. L. AND MISHKIN, M. (1994). Behaviorism, Cognitivism and the Neuropsychology of memory. *American Scientist*, vol.82, 30-37.
- PETROV, T.; JHAMANDAS, J. H. AND KRUKOFF, T. L. (1992a). Characterization of peptidergic efferents from the Lateral Parabrachial Nucleus to identified neurons in the rat Dorsal Rafe Nucleus. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 5 (5), 367-373.
- PETROV, T.; KRUKOFF, T. L. AND JHAMANDAS, J. H. (1992b). The Hypothalamic Paraventricular and Lateral Parabrachial nuclei receive collaterals from Raphe Nucleus neurons: A combined double retrograde and immunocytochemical study. *Journal of Comparative Neurology*, 318 (1), 18-26.
- PEYRON, R.; FROT, M.; SCHNEDER, F.; GARCÍA-LARREA, L.; MERTENS, P.; BARRAL, F. G.; SINDOU, M.; LAURENT, B. AND MAUGUIÈRE, F. (2002). Role of Operculoinsular cortices in human pain processing: Converging evidence from PET, fMRI, dipole modeling, and intracerebral recordings of evoked potentials. *NeuroImage*, 17, 1336-1346.
- PEYRON, R.; LAURENT, B. AND GARCÍA -LARREA, L., (2000). Functional imaging of brain responses to pain. A review and meta-analysis (2000). *Neurophysiologie Clinique*, 30: 263-88.

- PHAN, K. L.; TAYLOR, S. F.; WELSH, R. C.; HO, S.-H.; BRITTON, J. C.; AND LIBERZON, I. (2004). Neural correlates of individual ratings of emotional salience: a trial-related fMRI study. *NeuroImage*, 21 (2): 768-780.
- PHILLIPS, A. G. (1984). Brain reward circuitry: A case for separate systems. *Brain Research Bulletin*, 12, 195-201.
- PHILLIPS, A. G. AND FIBIGER, H. C. (1987). Anatomical and neurochemical substrates of drug reward determined by the conditioned place preference technique. En: Bozarth, M. A. (Ed.), *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs* (pp. 275-290). New York: Springer-Verlag.
- PHILLIPS, A.G. Y FIBIGER, H. C. (1989). Neuroanatomical bases of intracranial self-stimulation: untangling the Gordian knot. En: Liebman, J.M. y Cooper, S. J. *The Neuropharmacological Basis of Reward*, (Cap. 3, pp. 66-105), Oxford University Press.
- PHILLIPS, M. L.; YOUNG, A. W.; SENIOR, C.; BRAMMER, M.; ANDREW, C.; CALDER, A. J.; BULMORE, E. T.; PERRETT, D. I.; ROWLAND, D.; WILLIAMS, S. C.; GRAY, J. A. AND DAVID, A. S. (1997). A specific neural substrate for perception of facial expressions of disgust. *Nature*, 389, 495-498.
- PIERCE, R. C. AND KALIVAS P. W. (1997). A circuitry model of the expression of Behavioural sensitisation to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Research Reviews*, 25, 192-216.
- PINAZO, J. F. (1997). *Efectos de la Naloxona y de diferentes neurolepticos sobre la conducta agresiva inducida por el aislamiento y por el síndrome de abstinencia a la morfina en ratones macho*. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, España.
- PIZZAGALLI, D. A.; GREISCHAR, L. L. AND DAVIDSON, R. J. (2003). Spatio-temporal dynamics of brain mechanisms in aversive classical conditioning: high-density event-related potential and brain electrical tomography analyses. *Neuropsychologia*, 41(2):184-94.
- PORRINO, L. J. AND LYONS, D. (2000). Orbital and medial Prefrontal cortex and psychostimulant abuse: Studies in animal models. *Cerebral Cortex*, 10, 326-333.

- POULOS, C. AND CAPPELL, H. (1991). Homeostatic theory of drug tolerance: A general model of physiological adaptation. *Psychological Reviews*, 98 (3), 390-408.
- POWLEY, T. L.; BERTHOUD, H.R.; FOX, E. A. AND LAUGHTON, W. (1992). The dorsal vagal complex forms a sensory-motor lattice: The circuitry of gastrointestinal reflexes. In: Ritter, S.; Ritter, R. C. and Barnes, C. D. (Eds): *Neuroanatomy and Physiology of Abdominal Vagal Afferents*. Boca Raton: CRC Press, pp. 55-79.
- PRADO-ALCALA, R. AND WISE, R. A. (1984). Brain stimulation reward and dopamine terminal fields. I. Caudate-putamen, Nucleus Accumbens and Amygdala. *Brain Research*, 297: 265-273.
- PRICE, J. L. (1995). Thalamus. In Paxinos, G. (Ed.): *The Rat Nervous System*, 2<sup>a</sup> Edition San Diego: Academic Press, pp. 629-648.
- PRITCHARD, T. C.; MALACUSO, D. A. AND ESLINGER, P. J. (1999). Taste perception in patients with Insular Cortex lesions. *Behavioral Neuroscience*, 113 (4), 663-671.
- PUERTO, A.; DEUTSCH, J. A., MOLINA, F. AND ROLL, P. L. (1976a). Rapid discrimination of rewarding nutrient by the upper Gastrointestinal Tract. *Science*, 192, 485-487.
- PUERTO, A.; DEUTSCH, J. A.; MOLINA, F. AND ROLL, P. L. (1976b). Rapid rewarding effects of intragastric injections. *Behavioural Biology*, 18, 123-124.
- PUERTO, A. AND MOLINA, F. (1977). Sensitividad en el sistema gastrointestinal. *Revista de Psicología General y Aplicada*, 32, 146, 377-389.
- PUERTO, A. AND MOLINA, F. (1980). Aprendizaje interoceptivo. En: Guillamón, A. (Ed.), *Fundamentos Biológicos de la Conducta II*, (pp. 981-993). UNED.
- RADA, P. V. AND HOEBEL, B. G. (2001). Aversive hypothalamic stimulation releases acetylcholine in the Nucleus Accumbens, and stimulation-escape decreases it. *Brain Research*, 888, 60-65.
- RADA, P. V.; MARK, G. P. AND HOEBEL, B. G. (1998). Dopamine release in the Nucleus Accumbens by hypothalamic stimulation-escape behavior. *Brain Research*, 782, 228-234.

- RADA, P. V.; MARK, G. P.; YEOMANS, J. J. AND HOEBEL, B. G. (2000). Acetylcholine release in Ventral Tegmental Area by Hypothalamic self-stimulation, eating, and drinking. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 65 (3), 375-379.
- RAGNAUTH, A.; RUEGG, H. AND BODNAR, R. J. (1997). Evaluation of opioid receptor subtype antagonist effects in the ventral tegmental area upon food intake under deprivation, glucoprivic and palatable conditions. *Brain Research*, 767, 8-16.
- RAGOZZINO, M. E. AND KESNER, R. P., (1999). The role of the agranular Insular Cortex in working memory for food reward value and allocentric space en rats. *Behavioural Brain Research*, 98: 103-112.
- REBER, P. J.; KNOWLTON, B. J. AND SQUIRE, L. R. (1996). Dissociable properties of memory systems: Differences in the flexibility of declarative and nondeclarative knowledge. *Behavioural Neuroscience*, 110 (5), 861-871.
- REILLY, S. (1998). The role of the gustatory Thalamus in taste-guided behavior. *Neuroscience BioBehavioral Review*, 22 (6): 883-901.
- REILLY, S. (1999). The Parabrachial Nucleus and conditioned taste aversion. *Brain Research Bulletin*, 48 (3), 239-254.
- REILLY, S.; GRIGSON, P. S. AND NORGREN, R. (1993). Parabrachial Nucleus lesions and conditioned taste aversion: Evidence supporting an associative deficit. *Behavioural Neuroscience*, 107 (6), 1005-1017.
- REILLY, S. AND PRITCHARD, T. C. (1996a). Gustatory Thalamus lesions in the rat: I. Innate taste preferences and aversions. *Behavioural Neuroscience*, 110 (4), 737-745.
- REILLY, S. AND PRITCHARD, T. C. (1996b). Gustatory Thalamus lesions in the rat: II. Aversive and appetitive taste conditioning. *Behavioural Neuroscience*, 110 (4), 746-759.
- REILLY, S. AND TRIFUNOVIC, R. (2000a). Lateral Parabrachial Nucleus lesions in the rat: Long- and short-duration gustatory preference test. *Brain Research Bulletin*, 51 (2), 177-186.

- REILLY, S. AND TRIFUNOVIC, R. (2000b). Lateral Parabrachial Nucleus lesions in the rat: Aversive and appetitive gustatory conditioning. *Brain Research Bulletin*, 52 (4), 269-278.
- REYNOLDS, S. M. AND ZAHM, D. S. (2005). Specificity in the projections of Prefrontal and Insular Cortex to ventral Striatopallidum and Extended Amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 25 (50), 11757-11767.
- RIGAUD, D.; BETOULLE, D.; CHAUVEL, A.; ALBERTO, L. A.; APFELBAUM, M. (1994). Effects of postgastric energy loads on intake of sham meals of different palatability in rats. *American Journal of Physiology*, 267 (1 Pt 2): R 150-155.
- RITTER, S. (1994). Multiple metabolic controls of feeding. *Appetite*, 23, 199.
- RITTER, R. C., BRENNER, L. AND YOX, D. P. (1992a). Participation of vagal sensory neurons in putative satiety signals from the upper Gastrointestinal Tract. En: Ritter, S., Ritter, R. C. and Barnes, C. D. (Eds.), *Neuroanatomy and Physiology of Abdominal Vagal Afferents* , CRC Press, pp. 221-247.
- RITTER, S.; CALINGASAN, N. Y.; HUTTON, B. AND DINH, T. T. (1992b). Cooperation of vagal and central neural systems in monitoring metabolic events controlling feeding Behavior. En: Ritter, S., Ritter, R. C. and Barnes, C. D. (Eds.), *Neuroanatomy and Physiology of Abdominal Vagal Afferents* , CRC Press, pp. 249-277.
- RITTER, S.; MCGLONE, J. AND KELLEY, K. (1980). Absence of lithium-induced taste aversion after area Postrema lesion. *Brain Research*, 201, 501-506.
- ROBBINS, T. W. AND EVERITT, B. J. (1996). Neurobehavioral mechanisms of reward and motivation. *Current Opinion in Neurobiology*, 6, 228-236.
- ROBBINS, T. W. AND EVERITT, B. J. (1999). Motivation and Reward. En: Zigmond, M. J.; Bloom, F. E.; Landis, S. C.; Roberts, J. L.; Squire, L. R. (Eds). *Fundamental Neuroscience*, Academic Press.
- ROBBINS, T. W. AND EVERITT, B. J. (2002). Motivation and Reward. En: En: 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.

- ROBINSON, T. E. AND BERRIDGE, K. C. (2000). The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitisation view. *Addiction*, 95 (Suppl. 2), S91-S117.
- ROBINSON, T. E. AND BERRIDGE, K. C. (2003). Addiction. *Annual Reviews of Psychology*, 54, 10.1-10.29.
- ROBINSON, T. E. AND KOLB, B. (1990b). Morphine alters the structure of neurons in the nucleus Accumbens and Neocortex of rats. *Synapse*, 33, 160-162.
- ROBINSON, T. E. AND KOLB, B. (1999a). Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus Accumbens and Prefrontal Cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *European Journal of Neuroscience*, 11, 1598-1604.
- ROBINSON, T. E. AND KOLB, B. (1997). Persistent structural modifications in nucleus Accumbens and Prefrontal Cortex neurons produce by previous experience with amphetamine. *The Journal of Neuroscience*, 17 (21), 8491-8497.
- ROBINSON, T. E. AND KOLB, B. (2004). Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology*, 47, 33-46.
- ROBINSON, T. R.; GORNY, G.; SAVAGE, V. R. AND KOLB, B. (2002). Widespread but regionally specific effects of experimenter- versus self-administered morphine on dendritic spines in the nucleus Accumbens, Hippocampus, and Neocortex of adult rats. *Synapse*, 46, 271-279.
- ROGERS, R.; MCTIGUE, D. M. AND HERMANN, G. E. (1995). Vagovagal reflex control of digestion: Afferent modulation by neural and "endoneurocrine" factors. *American Journal Physiology*, 268 (31): G1-G10.
- ROGERS, R.; NOVIN, D. AND BUTCHER, L (1979). Hepatic sodium and osmoreceptors activate neurons in the ventrobasal Thalamus. *Brain Research*, 168, 398-403.
- ROITMAN, M. F.; NA, E.; ANDERSON, G.; JONES, T. A. AND BERNSTEIN, I. L. (2002). Induction of a salt appetite alters dendritic morphology in nucleus Accumbens and sensitizes rats to amphetamine. *The Journal of Neuroscience*, 22, RC225, 1-5.

- ROLLS, E. T. (1973). Refractory periods of neurons directly excited in stimulus-bound eating and drinking in the rat. *Journal Comparative and Physiological Psychology*, 82 (1): 15-22.
- ROLLS, E. T. (1982). Feeding and Reward. En: Hoebel, B. G. and Novin, D. (Eds.): *The Neural Basis of Feeding and Reward*, Haer Institute for Electrophysiological Research, pp. 323-328.
- ROLLS, E. T. (1994). Neural processing related to feeding in primates. En: Legg, C. R. y Booth, D. A. (Eds.) *Appetite*, OUP, pp. 11-53.
- ROLLS, E. T. (1996). Neural processing related to feeding in primates. En: Legg, C. R. and Booth, D. A. (Eds.) *Appetite*, OUP, pp. 11-53.
- ROLLS, E. T. (1997). Taste and olfactory processing in the brain and its relation to the control of eating. *Critical Reviews in Neurobiology*, 11, (4), 263-287.
- ROLLS, E. T. (1999). *The brain and emotion*. Oxford University Press.
- ROLLS, E. T. (2000). Memory Systems in the Brain. *Annual Reviews of Psychology*, 51, 599-630.
- ROLLS, E. T.; BURTON, M. J. AND MORA, F. (1976). Hypothalamic neuronal responses associated with the sight of food. *Brain Research*, 111, 53-66.
- ROLLS, E. T.; BURTON, M. J. AND MORA, F. (1980). Neurophysiological analysis of brain-stimulation reward in the monkey. *Brain Research*, 194, 339-357.
- ROLLS, E. T.; PERRET, D.; THORPE, S. J.; PUERTO, A.; ROPER-HALL, A. AND MADDISON, S. (1979). Responses of neurons in area 7 of the Parietal Cortex to objects of different significance. *Brain Research*, 169 (1): 194-198.
- ROSENBLUM, K.; MEIRI, N. AND DUDAI Y. (1993). Taste memory: The role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behavioral and Neural Biology*, 59, 49-56.
- ROUTTENBERG, A. (1976). Self-Stimulation Pathways: Origins and Termination -a three stage technique-. En: Wauquier, A. and Rolls, E. T. (Eds): *Brain-Stimulation Reward*, North-Holland Publishing Company, Cap. 2.



- ROWLAND, N. E.; MORIEN, A. AND LI, B.-H. (1996). The physiology and brain mechanisms of feeding. *Nutrition*, 12, (9): 626-639.
- RUGGIERO, D. A.; UNDERWOOD, M. D.; MANN, J. J.; ANWAR, M. AND ARANGO, V. (2000). The human nucleus of the Solitary Tract: Visceral pathways revealed with an “in vitro” postmortem tracing method. *Journal of Autonomic Nervous System*, 79 (2-3): 181-190.
- SAKAGUCHI, T. AND YAMAZAKI, M. (1986). Changes in water intake following hepatic vagotomy in young rats. *Journal of Autonomic Nervous System*, 17 (3): 243-246.
- SAKAI, N. AND YAMAMOTO, T. (1997). Conditioned taste aversion and C-Fos expression in the rat brainstem after administration of various USs. *NeuroReport*, 8, 2215-2220.
- SAKAI, N. AND YAMAMOTO, T. (1998). Role of the Medial and Lateral Parabrachial Nucleus in acquisition and retention of conditioned taste aversion in rats. *Behavioral Brain Research*, 93, 63-70.
- SAKAI, N. AND YAMAMOTO, T. (1999). Possible routes of visceral information in the rat brain in formation of conditioned taste aversion. *Neuroscience Research*, 35, 53-61.
- SAKO, N.; HARADA, S. AND YAMAMOTO, T. (2000). Gustatory information of umami substances in three major taste nerves. *Physiology and Behavior*, 71 (1-2): 193-8.
- SALAMONE, J. D. (1994). The involvement of Nucleus Accumbens dopamine in appetitive and aversive motivation. *Behavioral Brain Research*, 61, 117-133.
- SALAMONE, J. D.; COUSINS, M. S. AND SNYDER, B. J. (1997). Behavioural functions of Nucleus Accumbens dopamine: Empirical and conceptual problems with the anhedonia hypothesis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21 (3), 341-359.
- SALEEM, K. S.; KONDO, H. AND PRICE, J. L. (2008). Complementary circuits connecting the Orbital and medial Prefrontal networks with the Temporal, Insular, and Opercular Cortex in the Macaque monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, 506, 659-693.
- SALEH, T. M. AND CECHETTO, D. F. (1993). Peptides in the Parabrachial Nucleus modulate visceral input to the Thalamus. *American Journal of Physiology*, 264 (4), R668-R675.

- SANGER, D. J. AND McCARTHY, P. S. (1981). Increased food and water intake produced in rats by opiate receptor agonists. *Psychopharmacology*, 74, 217-220.
- SANTIAGO, A. C. AND SHAMMAH-LAGNADO, S. J. (2005). Afferent connections of the Amigdalopiriform transitions area in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 489, 349-371.
- SAPER, C. B. (1982). Reciprocal Parabrachial-Cortical connections in the rat. *Brain Research*, 242, 33-40.
- SAPER, C. B. (1995b). The Spinoparabrachial Pathway: Shedding new light on an old path. *The Journal of Comparative Neurology*, 353, 477-479.
- SAPER, C. B. (1995). Central Autonomic System. En: Paxinos, G.: *The rat nervous system, Second Edition*. Academic Press. pp.107-128.
- SAPER, C. B. (2004). Central Autonomic System. En: Paxinos, G. and Mai, K. (Eds.): *The rat nervous system, Third Edition*. Elsevier. pp. 761-796.
- SAPER, C. B.; CHOU, T. C. AND ELMQUIST, J. K. (2002). The need to feed: Homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron*, 36 (2), 199-211.
- SAPER, C. B. AND LOEWY, A. D. (1980). Efferent connections of Parabrachial nucleus in the rat. *Brain Research*, 197, 291-317.
- SAWCHENKO, P. E. (1983). Central connections of sensory and motor nuclei of Vagus nerve. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 9, 13-26.
- SCALERA, G.; SPECTOR, A. C. AND NORGREN, R. (1995). Excitotoxic lesions of the Parabrachial Nuclei prevent conditioned taste aversion and sodium appetite in rats. *Behavioural Neuroscience*, 109 (5), 997-1008.
- SCHAEFFER, L. A.; KOCH, J. E. AND 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.

- SCHECTER, M. D. AND CALCAGNETTI, D. (1998). Continued trends in the conditioned place preference literature from 1992 to 1996, inclusive, with a cross-indexed bibliography. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22 (6), 827-846.
- SCHILDEIN, S.; AGMO, A.; HUSTON, J. P. AND SCHWARTING, R. K. (1998). Intraaccumbens injections of substance P, morphine and amphetamine: Effects on conditioned place preference and Behavioural activity. *Brain Research*, 790 (1-2): 185-194.
- SCHOENBAUM, G.; CHIBA, A. A. AND GALLAGHER, M. (1998). Orbitofrontal cortex and basolateral Amygdala encode expected outcomes during learning. *Nature Neuroscience*, 1 (2): 155-159.
- SCHROEDER, B. E.; BINZAK, J. M. AND KELLEY, A. E. (2001). A common profile of prefrontal cortical activation following exposure to nicotine or chocolate-associated contextual cues. *Neuroscience*, 105, 535-545.
- SCHROEDER, B. E.; HOLAHAN, M. R.; LANDRY, C. F. AND KELLEY, E. (2000). Morphine-associated environmental cues elicit conditioned gene expression. *Synapse*, 37, 146-158.
- SCHROEDER, B. E. AND KELLEY, A. E. (2002). Conditioned Fos expression following morphine-paired contextual cue exposure is environment specific. *Behavioural Neuroscience*, 116 (4) 727-732.
- SCHROEDER, J. P. AND PACKARD, M. G. (2000). Differential effects of Intra-amygdala lidocaine infusion on memory consolidation and expression of a food conditioned place preference. *Psychobiology*, 28 (4), 486-491.
- SCHUL, R.; SLOTNICK, B. M. AND DUDAI, Y. (1996). Flavor and the Frontal cortex. *Behavioural Neuroscience*, 110, (4): 760-765.
- SCHULTZ, W. (1997). Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology*, 7, 191-197.
- SCHULTZ, W.; DAYAN, P.; AND MONTAGUE, R. R. (1997). A neural substrate of prediction and reward. *Science*, 1593-1599.

- SCHWARTZBAUN, J. (1983). Electrophysiology of taste-mediated functions in Parabrachial nuclei of behaving rabbit. *Brain Research*, 11, 61-89.
- SCOTT, T. H.; PLATA-SALAMAN, C. AND SMITH-SWINTOSKY, V. (1994). Gustatory neural coding in the monkey cortex: the quality of saltiness. *Journal of Neurophysiology*, 71(5), 1692-1701.
- SCOTT, T. R. (1990). The effect of physiological need on taste. En: Capaldi, E. D. and Powley, T. L. (Eds.). *Taste, experience, and feeding*. American Psychological Association, Washington, dc, 1990, pp. 45-61.
- SEE, R. E. (2002). Neural substrates of conditioned-cued relapse to drug-seeking Behavior. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 71, 517-529.
- SELL, L. A.; MORRIS, J.; BEARN, J.; FRACKOWIAK, R. S. J.; FRISTON, K. J. AND DOLAN, R. J. (1999). Activation of reward circuitry in human opiate addicts. *European Journal of Neuroscience*, 11, 1042-1048.
- SELL, L. A.; MORRIS, J. S.; BEARN, J.; FRACKOWIAK, R. S. J.; FRISTON, K. J. AND DOLAN, R. J. (2000). Neural responses associated with cue emotional states and heroin in opiate addicts. *Drug and Alcohol Dependence*, 60: 207-216.
- SEWARDS, T. V. (2004). Dual separate pathways for sensory and hedonic aspects of taste. *Brain Research Bulletin*, 62 (4):271-283.
- SEWARDS, T. V. AND SEWARDS, M. (2002). Separate, parallel sensory and hedonic pathways in the mammalian somatosensory system. *Brain Research Bulletin*, 58 (3):243-60.
- SEWARDS, T. V. AND SEWARDS, M. A. (2001). Cortical association areas in the gustatory system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25, 395-407.
- SHAPIRO, R. AND MISELIS, R. (1985a). The central ventral connections of the area Postrema of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 243, 344-364.
- SHAPIRO, R. AND MISELIS, R. (1985b). The central organization of the Vagus Nerve innervating the stomach of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 238 (4): 473-488.

- SHI, C. J. AND CASSELL, M. D. (1998). Cortical, thalamic, and amygdaloid connections of the anterior and posterior Insular Cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 399, 440-468.
- SHI, C. J. AND CASSELL, M. D. (1998b). Cascade projections from Somatosensory Cortex to the rat basolateral Amygdala via the parietal Insular Cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 399, 469-491.
- SHI, X. D.; REN, W.; WNAG, G. B.; LUO, F.; HAN, J. S. AND CUI, C. L. (2003). Brain opioid-receptors are involved in mediating peripheral electric stimulation-induced inhibition of morphine conditioned place preference in rats. *Brain Research*; 981 (1-2):23-9.
- SHIMURA, T.; SUZUKI, M. AND YAMAMOTO, T. (1995). Aversive taste stimuli facilitate extracellular acetylcholine release in the Insular Gustatory Cortex of the rat: A microdialysis study. *Brain Research*, 679, 221-226.
- SHIMURA, T.; TANAKA, H. AND YAMAMOTO, T. (1997). Salient responsiveness of Parabrachial neurons to the conditioned stimulus after the acquisition of taste aversion learning in rats. *Neuroscience*, 81 (1), 239-247.
- SHIN, L. M.; DOUGHERTY, D. D.; ORR, S. P.; PITMAN, R. K.; LASKO, M.; MACKLIN, M. L.; ALPERT, N. M.; FISCHMAN, A. J. AND RAUCH, S. L. (2000). Activation of anterior paralimbic structures during guilt-related scrip-driven imagery. *Biological Psychiatry*, 48: 43-50.
- SHIPLEY, M. T. AND GEINISMAN, Y. (1984). Anatomical evidence for a convergence of olfactory, gustatory an visceral afferent pathways in mouse cerebral cortex. *Brain Research Bulletin*, 12: 221-226.
- SHIPLEY, M. T. AND SANDERS, M. (1982). Special senses are really special: Evidence for a reciprocal bilateral pathway between Insular Cortex and nucleus Parabrachialis. *Brain Research*, 8: 493-501.
- SHIPPENBERG, T. S. AND BALS-KUBIK, R. (1995). Involvement of the Mesolimbic Dopamine System in mediating the aversive effects of opioid antagonists in the rat. *Behavioural Pharmacology*, 6, 99-106.

- SHIPPENBERG, T. S.; BALS-KUBIK, R. AND 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 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 265 (1), 53-59.
- SHIPPENBERG, T. S.; CHEFER, V. I.; ZAPATA, A. AND HEIDBREder, C. A. (2001). Modulation of the behavioural and neurochemical effects of psychostimulants by  $\kappa$ -opioid receptor systems. En: Quiñones-Jenab, V. (Ed.): *The biological basis of cocaine addiction*, vol. 937, 50-73. Annals of the New York Academy of Sciences.
- SHIPPENBERG, T. S. AND ELMER, G. I. (1998). The neurobiology of opiate reinforcement. *Critical Reviews in Neurobiology*, 12 (4), 267-303.
- SHIZGAL, P. (1989). Toward a cellular analysis of intracranial self-stimulation: Contributions of collision studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 13, 81-90.
- SHIZGAL, P. AND MURRAY, B. (1989). Neuronal basis of intracranial self-stimulation. En: Lieberman, J.M. y Cooper, S.J. *The Neuropharmacological Basis of Reward*, Oxford University Press, Cap. 4, pp. 106-163.
- SIEGEL, S. (1999). Drug anticipation and drug addiction. The 1998 H. David Archibald Lecture. *Addiction*, 94 (8), 1113- 1124.
- SIEGEL, S.; BAPTISTA, M. A. S.; KIM, J. A.; McDONALD, R. V. AND WEISE-KELLY, L. (2000). Pavlovian psychopharmacology: The associative basis of tolerance. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 8 (3), 276-293
- SIEGEL, S. AND KIM, J. A. (2000). Absence of cross-tolerance and the situational specificity of tolerance. *Palliative Medicine*, 14 (1): 75-77.
- SIEGEL, S. AND RAMOS, B. M. C. (2002). Applying laboratory research: Drug anticipation and the treatment of drug addiction. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 10 (3), 162-183.

- SIM, L. J.; SELLEY, D. E.; DWORKIN, S. I. AND CHILDERS, S. R. (1996). Effects of chronic morphine administration on  $\mu$  opioid receptor-stimulated [ $^{35}$  S] GTP $\gamma$ S autoradiography in rat brain. *The Journal of Neuroscience*, 16 (8), 2684-2692.
- SIMANSKY, K. J.; JEROME, C.; SANTUCCI, A. AND SMITH, G. P. (1982). Chronic hypodipsia to intraperitoneal and subcutaneous hypertonic saline after vagotomy. *Physiology and Behavior*, 28 (2): 367-370.
- 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 eléctrica o administración enteral de nutrientes*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España.
- SIMÓN, M. J.; GARCÍA, R.; ZAFRA, M. A.; MOLINA, F. AND PUERTO, A. (2007). Learned preferences induced by electrical stimulation of a food-related area of the Parabrachial complex: Effects of naloxone. *Neurobiology Learning and Memory*, 87: 332–342.
- SIMÓN, M. J.; ZAFRA, M. A.; MOLINA, F. AND PUERTO, A. (2008). Consistent rewarding or aversive effects of the electrical stimulation of the lateral Parabrachial complex. *Behavioral Brain Research*, 190 (1): 67-73.
- SIM-SELLEY, L. J.; SELLEY, D. E.; VOGT, L. J. CHILDERS, S. R. AND MARTIN, T. J. (2000). Chronic heroin self-administration desensitizes  $\mu$  opioid receptor-activated G-proteins in specific regions of rat brain. *The Journal of Neuroscience*, 20 (12), 4555-4562.
- SINCHAIKUK, S.; HO, I. K. AND ROCKHOL, R. W. (2002). Focal  $\kappa$ -opioid receptor-mediated dependence and withdrawal in the Nucleus Paragigantocellularis. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 74 (1), 241-252.
- SIVIY, S. M.; CALCAGNETTI, D. J. AND REID, L. D. (1982). Opioids and Palatability. En: Hoebel, B. G. and Novin, D. (Eds.): *The Neural Basis of Feeding and Reward*, (pp. 517-524), Haer Institute for Electrophysiological Research.

- SKLAIR-TAVLRON, L.; SHI, W.-X.; LANE, S.; HARRIS, H. W.; BUNNEY, B. S. AND NESTLER, E. J. (1996). Chronic morphine induces visible changes in the morphology of Mesolimbic dopamine neurons. *Proceedings National Academy of Science USA*, 93, 11202-11207.
- SKOUBIS, P. D.; MATTHES, H. W.; WALWYN, W. M.; KIEFER, B. L. AND MAIDMENT, N. T. (2001). Naloxone fails to produce conditioned place aversion in  $\mu$ -opioid receptor knockout mice. *Neuroscience*, 106 (4), 757-763.
- SLUGG, R. M. AND LIGHT, A. R. (1994). Spinal cord and Trigeminal projections to the pontine Parabrachial region in the rat as demonstrated with Phaseolus Vulgaris Leucoagglutinin. *Journal of Comparative Neurology*, 339 (1), 49-61.
- SMALL, D. M. (2002). Toward an understanding of the brain substrates of reward in humans. *Neuron*, 33, 668-671.
- SMALL, D. M.; GREGORY, M. D.; MAK, Y. E.; GITELMAN, D.; MESULAM, M. M. AND PARRISH, T. (2003). Dissociation of neural representation of intensity and affective valuation in human gustation. *Neuron*, 39, 701-711.
- SMALL, D. M.; ZALD, D. H.; LONES-GOTMAN, M.; ZATORRE, R. J.; PARDO, J. V.; FREY, S. AND PETRIDES, M. (1999). Human cortical gustatory areas: A review of functional neuroimaging data. *NeuroReport*, 10, 7-14.
- SMALL, D. M.; ZATORRE, R. J.; DAGHER, A.; EVANS, A. C. AND JONES-GOTMAN, M. (2001). Changes in brain activity related to eating chocolate. From pleasure to aversion. *Brain*, 124, 1720- 1733.
- SMITH, D. V. AND SHEPHERD, G. M. (2002). Chemical Senses: Taste and Olfaction. En: 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. 24.
- SMITH, J. W.; FETSKO, L. A. AND WANG, Y. (2002). Dopamine D2L receptor knockout mice display deficits in positive and negative reinforcing properties of morphine and in avoidance learning. *Neuroscience*, 113 (4), 755-765.



- SÖDERPALM, A. H. V. AND BERRIDGE, K. C. (2000). The hedonic impact and intake of food are increased by midazolam microinjection in the Parabrachial Nucleus. *Brain Research*, 877, 288-297.
- SOKOLOWSKI, J. D.; CONLAN, A. N. AND 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.
- SPANAGEL, R.; HERZ, A. AND SHIPPENBERG, T. S. (1992). Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the Mesolimbic dopaminergic pathway. *Proceedings National Academy Sciences USA*, 89, 2046-2050.
- SPECTOR, A. C. (2000). Linking gustatory neurobiology to Behavior in vertebrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24 (4), 391-416.
- SPECTOR, A. C.; NORGRÉN, R. AND GRILL, H. J. (1992). Parabrachial gustatory lesions impair taste aversion learning in rats. *Behavioural Neuroscience*, 106(1), 147-161.
- SPIGA, S.; SERRA, G. P.; PUDDU, M. C.; FODDAI, M. AND DIANA, M. (2003). Morphine withdrawal-induced abnormalities in the VTA: Co-focal laser scanning microscopy. *European Journal of Neuroscience*, 17, 605-612,
- SPITIERI, T.; LE PAPE, G. AND AGMO, A. (2000). What is learned during place preference conditioning? A comparison of food- and morphine- induced reward. *Psychobiology*, 28 (3), 367-382.
- SQUIRE, L. R. (1987). *Memory and brain*. New York: Oxford Univ. Press.
- SQUIRE, L. R. (1992). Declarative and non-declarative memory: Multiple brain systems supporting learning and memory. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 4 (3), 232-243.
- SQUIRE, L. R. (1998). Memory systems. *Life Sciences*, 321, 153-156.
- SQUIRE, L. R. AND ZOLA, S. M. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings National Academy Sciences*, 93, 13515-13522.

- STAPLETON, J. M.; LIND, M. D.; MERRIMAN, V. J. AND REID, L. D. (1979). Naloxone inhibits diazepam-induced feeding in rat. *Life Sciences*, 24, 2421-2426.
- STEFURAK, T. L. AND VAN DER KOOY, D. (1992). Saccharin's Rewarding, Conditioned Reinforcing, and Memory-Improving Properties: Mediation by Isomorphic or Independent Processes? *Behavioural Neuroscience*, 106 (1), 125-139.
- STEFURAK, T. L. AND VAN DER KOOY, D. (1994). Tegmental Pedunculo-pontine lesions in rats decrease saccharin's rewarding effects but not its memory-improving effect. *Behavioural Neuroscience*, 108 (5), 972-980.
- STEINER, J. E.; GLASER, D.; HAWILO, M. E. AND BERRIDGE, K. C. (2001). Comparative expression of hedonic impact: Affective reactions to taste by human infants and other primates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25, 53-74.
- STELLAR, J. R. AND NEELEY, S. P. (1982). Reward summation function measurements of Lateral Hypothalamic stimulation reward: Effects of Anterior and Posterior Medial Forebrain Bundle lesion. En: Hoebel, B. G. and Novin, D. (Eds.): *The Neural Basis of Feeding and Reward*, Haer Institute for Electrophysiological Research, pp. 431-444.
- STELLAR, J. R. AND RICE, M. B. (1989). Pharmacological basis of intracranial self-stimulation reward. En: Lieberman, J.M. y Cooper, S.J. *The Neuropharmacological Basis of Reward*, Oxford University Press, Cap. 2, pp. 14-65.
- STEWART, M. G., SAVORY, C. J. AND HARRISON, E. (1996). Mu-Opioid receptor binding in chicken brain in relation to degree of food restriction: a quantitative autoradiographic study. *Brain Research*, 742, 343-346.
- STINUS, L.; CAILLE, S. AND KOOB, G. F. (2000). Opiate withdrawal-induced place aversion lasts for up to 16 weeks. *Psychopharmacology (Berl)*. 149 (2):115-20.
- STINUS, L.; LE MOAL, M. AND KOOB; G. F. (1990). Nucleus Accumbens and Amygdala are possible substrates for the aversive stimulus effects of opiate withdrawal. *Neuroscience*, 37 (3): 767-773.

- STRICKER, E. M.; CURTIS, K. S.; PEACOCK, K. A. AND SMITH, J. C. (1997). Rats with area Postrema lesions have lengthy eating and drinking bouts when fed ad libitum: Implications for feedback inhibition of ingestive behavior. *Behavioural Neuroscience*, 111 (3): 623-632.
- STROMINGER, N. L.; KNOX, A. P. AND CARPENTER, D. O. (1994). The connectivity of the area Postrema in the ferret. *Brain Research Bulletin*, 33, 33-47.
- SUEMORI, K.; KOBASHI, M. AND ADACHI, A. (1994). Effects of gastric distension and electrical stimulation of dorsomedial Medulla on neurons in Parabrachial nucleus of rats. *Journal of Physiology and Behavior*, 48, 221-229.
- SUN, S.-G. AND DALMAN, F. C. (2003). Evidence for multiple mechanism of kappa opioid tolerance in mesencephalic cultures. *Brain Research*, 973, 122-130.
- SVINGOS, A. L.; CHENG, P. Y.; CLARKE, C. L. AND PICKEL, V. M. (1995). Ultrastructural localization of  $\delta$ -opioid receptor and Met-enkephalin immunoreactivity in rat Insular Cortex. *Brain Research*, 700, 25-39.
- SWANK, M. W. AND BERNSTEIN, I. L. (1994). C-Fos induction in response to a conditioned stimulus after single trial taste aversion learning. *Brain Research* 636, 202-208.
- SWANSON, L. W. (1992). *Brain Maps: Structure of the Rat Brain*, Elsevier.
- SWITHERS, M. M. (1996). Effects of oral experience on rewarding properties of oral stimulation. *Neuroscience Biobehavioral Review*, 20(1): 27-32.
- TAKAKI, A.; NAGAI, K.; TAKAKI, S.; YANAIHARA, N. AND NAKAGAWA, H. (1990). Satiety function of neurons containing a CCK-like substance in the dorsal Parabrachial Nucleus. *Physiology and Behavior*, 48, 865-871.
- TANDA, G. AND GOLDBERG, S. R. (2003). Cannabinoids: Reward, dependence and underlying neurochemical mechanisms. A review of recent preclinical data. *Psychopharmacology*, 169, 115-134.

- TAYLOR, D. A. AND FLEMING, W. W. (2001). Unifying perspectives of the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 297 (1): 11-18.
- TEHOVNIK, E. J. (1996). Electrical stimulation of neural tissue to evoke behavioural responses. *Journal of Neuroscience Methods*, 65, 1-17.
- TERENZI, M. T.; REES, H. AND ROBERTS, M. H. (1992). The pontine Parabrachial region mediates some of the descending inhibitory effects of stimulating the anterior Pretectal nucleus. *Brain Research*, 594, 205-214.
- THOMPSON, R. F. (1988). The neural basis of basic associative learning of discrete behavioural responses. *Trends in Neuroscience*, 11, 170-175.
- TOATES, F. (1989). *Sistemas Motivacionales*. En: Gray, J. (Ed.). Debate (1ª edición. en castellano).
- TOATES, F. (2001). *Biological psychology: an integrative approach*. En Toates, F. (Ed.). Prentice Hall, cap. 16 (387-412).
- TRAVERS, J. B. (1988). Efferent projections from the anterior nucleus of the Solitary Tract of the hamster. *Brain Research*, 457, 1-11.
- TRAVERS, J. B.; GRILL, H. AND NORGREN, R. (1987). The effects of Glossopharyngeal and Chorda Tympani nerve cuts on the ingestion and rejection of sapid stimuli: An electromyographic analysis in the rat. *Behavioral Brain Research*, 25, 233-246.
- TREEDE, R.; APKARIAN, A. V.; BROMM, B.; GREENSPAN, J.D. AND LENZ, F. A. (2000). Cortical representation of pain: Functional characterization of nociceptive areas near the lateral Sulcus. *Pain*, 87, 113-119.
- TREIT, D. AND BERRIDGE, K. C. (1990). A comparison of Benzodiazepine, Serotonin, and Dopamine agents in the taste-reactivity paradigm. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 37, 451-456.

- TREMBLAY, L. AND SCHULTZ, W. (1999). Relative reward preference in primate Orbitofrontal cortex. *Nature*, 398, 704-708.
- TRIFUNOVIC, R. AND REILLY, S. (2001). Medial versus Lateral Parabrachial Nucleus lesions in the rat: Effects Cholecystokinin -and D-Fenfluramine- induced anorexia. *Brain Research*, 894,288-296.
- TROWILL, J. A.; PANKSEPP, J. AND GANDELMAN, R. (1969). An incentive model of rewarding brain stimulation. *Psychological Review*, 76 (3), 264-281.
- TSUJI, M.; NAKAGAWA, Y.; ISHIBASHI, Y.; YOSHII, T.; TAKASHIMA, T.; SHIMADA, M. AND SUZUKI, T. (1996). Activation of ventral tegmental GABA<sub>B</sub> receptors inhibits morphine-induced place preference in rats. *European Journal of Pharmacology*, 313,169-173.
- TURENNE, S.D., MILES, C., PARKER, L. A. AND SIEGEL, S. (1996). Individual differences in reactivity to the rewarding/aversive properties of drugs: Assessment by taste and place conditioning. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 53(3), 511-516.
- 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 Neurobiology*, 56, 613-672.
- TZSCHENTKE, T. M. (2001). Pharmacology and behavioural pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Progress in Neurobiology*, 63, 241-320.
- TZSCHENTKE, T. M. AND SCHMIDT, W. J. (1999). Functional heterogeneity of the rat Medial Prefrontal Cortex: Effects of discrete subarea-specific lesions on drug-induced conditioned place preference and behavioural sensitization. *European Journal of Neuroscience*, 11, 4099-4109.
- ULLSPERGER, M. AND VON CRAMON, D. Y. (2003). Error monitoring using external feedback: specific roles of the Habenular complex, the reward system, and the Cingulate Motor area revealed by functional magnetic resonance imaging. *Journal of Neuroscience*, 23 (10), 4308-4314.

- VACCARINO, F. J. (1996). Dopamine-Opioid mechanisms in ingestion. En: Cooper, S. J. and Clifton, P. G. : *Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior*. Academic Press, pp. 219-231.
- VAN DER KOOY D. (1987). Place Conditioning: A simple and effective method for assessing the motivational properties of drugs. En: Bozarth (Ed.), *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs* (pp. 229-240). New York: Springer-Verlag.
- VAN DER KOOY D. AND KODA, L. (1983). Organization of the projections of a Cincunventricular organ: The Area Postrema in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 219, 328-338.
- VAN DER KOOY D.; MUCHA, R. F. ; O'SHAUGHNESSY, M. AND BUCENIEKS, P. (1982). Reinforcing effects of brain microinjections of morphine revealed by conditioned place preference. *Brain Research*, 243: 107-117.
- VAN ITALLIE, T. B. AND KISSILEFF, H. R. (1983). The physiological control of energy intake: an econometric perspective. *The American of Clinical Nutrition*, 38, 978-988.
- VAN REE, J. M.; GERRITS, M. A. F. M. AND VANDERSCHUREN, L. J. M. J. (1999). Opioids, reward and addiction: An encounter of Biology, Psychology, and Medicine. *Pharmacological Reviews*, 51 (2), 341- 396.
- VAN REE, J. M.; NIESINK, R. J.; VAN WOLFSWINKEL, L.; RAMSEY, N. F.; KORNET, M. M.; VAN FURTH, W. R.; VANDERSCHUREN, L. J.; GERRITS, M. A. AND VAN DEN BERG, C. L. (2000). Endogenous opioids and reward. *European Journal of Pharmacology*, 405 (1-3): 89-101.
- VAN REE, J. M. AND RAMSEY, N. (1987). The dopamine hypothesis of opiate reward challenged. *European Journal of Pharmacology*, 134, 239-43.
- VAUGHAN, C. W.; INGRAM, S. L.; CONNOR, M. A. AND CHRISTIE, M. J. (1997). How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature*, 390, 611-618.
- VERTES, R. P. (2004). Differential projections of the Infralimbic and Prelimbic Cortex in the rat. *Synapse*, 51, 32-58.

- VETULANI, J. (2001). Drug addiction. Part II. Neurobiology of addiction. *Polish Journal of Pharmacology*, 53, 303-317.
- VEZINA, P. AND STEWART, J. (1987). Conditioned locomotion and place preference elicited by tactile cues paired exclusively with morphine in an open field. *Psychopharmacology* 131, 115-122.
- VIGANÒ, D.; RUBIN, T.; DI CHIARA, G.; ASCARI, I.; MASSI, P. AND PAROLAR, D. (2003).  $\mu$  Opioid receptor signalling in morphine sensitisation. *Neuroscience*, 117, 921-929.
- VILPOUX, C.; CARPENTIER, C.; LEROUX-NICOLLET, I.; NAUDON, L. AND COSTENTIN, J. (2002). Differential effects of chronic antidepressant treatments on  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors in rat brain. *European Journal of Pharmacology*, 443, 85-93.
- VOLKOW, N. D.; WANG, G.-J.; FOWLER, J. A. AND GOLDSTEIN, R. Z. (2006). Imaging the addicted brain. En: Madras, B. K.; Colvis, C. M.; Pollock, J. D.; Rutter, J. L.; Shurteff, D. and von Zastrow, m. (Eds.). *Cell Biology of Addiction*, cap. 6, 93-107. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- VON ZASTROW, M. AND EVANS, C. (2006). Opioids as a model for cell biological studies of addictive drug action. En: Madras, B. K.; Colvis, C. M.; Pollock, J. D.; Rutter, J. L.; Shurteff, D. and von Zastrow, m. (Eds.). *Cell Biology of Addiction*, cap. 11, 193-110. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- WALL, P. D. AND MELZACK, R. (1998). *Textbook of Pain*. Churchill Livingstone, 4<sup>th</sup> Edition.
- WANG, G.; VOLKOW, N. D.; POWLER, J. S.; CERVANY, P.; HITZEMANN, R. J.; PAPPAS, N. R.; WONG, C. T. AND FELDER, C. (1999b). Regional brain metabolic activation during craving elicited by recall of previous drug experiences. *Life Sciences*, 64 (9), 775-784.
- WANG, L.; CARDIN, S.; MARTINEZ, V.; TACHE, I. AND LLOYD, C. K. (1999). Duodenal loading with glucose induces Fos expression in rat brain: selective blockade by devazepide. *The American Journal of Physiology*, 277 (3) R667-R674.

- WANG, L. G.; LI, H. M. AND LI, J. S. (1994). Formalin induced Fos-Like immunoreactive neurons in the Trigeminal Spinal caudal subnucleus project to contralateral Parabrachial Nucleus in the rat. *Brain Research*, 649, 62-70.
- WEISS, F.; CICCOCIOPPO, R.; PARSONS, L. H.; KATNER, S.; LIU, X.; ZORRILLA, E. P.; VALDEZ, G. R. AND RICHTER, R. R. (2001). En: Quiñones-Jenab, V. (Ed.): *The biological basis of cocaine addiction*, vol. 937, 1-26. Annals of the New York Academy of Sciences.
- WELZL, H.; D'ADAMO P. AND LIPP, H. (2001). Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm. *Behavioural Brain Research*, 125, 205-213.
- WHITE, F. J. (2002). A behavioural/ systems approach to the neuroscience of drug addiction. *The Journal of Neuroscience*, 22 (9), 3303-3305.
- WHITE, N. M. AND MILNER, P. M. (1992). The Psychobiology of Reinforcers. *Annual Reviews of Psychology*, 43, 443-471.
- WHITE, N. M.; NESSIER, C. AND CARR, G. D. (1987). Operationalizing and measuring the organizing influence of drugs on behavior. En: Bozarth (Ed.), *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs* (pp. 591-618). New York: Springer-Verlag.
- WHITEHEAD, M. C. (1990). Subdivisions and neuron types of the nucleus of the Solitary Tract that project to the Parabrachial Nucleus in the hamster. *Journal of Comparative Neurology*; 301 (4): 554-574.
- WILSON, A. M.; SOIGNIER, R. D.; ZADINA, J. E.; KASTIN, A. J. NORES, W. L.; OLSON, R. D. AND OLSON, G. A. (2000). Dissociation of analgesic and rewarding effects of endomorphin-1 in rats. *Peptides*, 21, 1871-1874.
- WISE, R. A. (1989). The brain and reward. En: Lieberman, J.M. y Cooper, S.J. *The Neuropharmacological Basis of Reward*, Oxford University Press, Cap. 9, pp.377-424.
- WISE, R. A. (1994). A brief history of the anhedonia hypothesis. En: Legg, C. R. and Booth, D. A. (Eds.) *Appetite*, OUP, pp. 243-263.



- WISE, R. A. (1996). Neurobiology of addiction. *Current opinion in Neurobiology*, 6: 243-251.
- WISE, R. A. (1996b). 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. (2002). Brain reward circuitry: Insights from unsensed incentives. *Neuron*, Volume 36, 10 (2), 229-240.
- WISE, R. A. (2005). Forebrain substrates of reward and motivation. *The Journal of Comparative Neurology*, 493, 115-121.
- WISE, R. G.; ROGERS, R.; PAINTER, D.; BANTICK, S.; PLOGHAUS, A.; WILLIAMS, P.; RAPEPORT, G. AND TRACEY, I. (2002). Combining fMRI with a pharmacokinetic model to determine which brain areas activated by painful stimulation are specifically modulated by remifentanyl. *NeuroImage*, 16, 999-1014.
- WISE, R. A. AND ROMPRE, P. P. (1989). Brain dopamine and reward. *Annual Reviews of Psychology*, 40, 191-225.
- WOLINSKY, T. S.; CARR, K. D.; HILLER, J. M. AND SIMON, E. J. (1994). Effects of chronic food restriction on  $\mu$  and  $k$  opioid binding in rat forebrain: A quantitative autoradiographic study. *Brain Research*, 656, 274-280.
- WOLINSKY, T. S.; CARR, K. D.; HILLER, J. M. AND SIMON, E. J. (1996). Chronic food restriction alters  $\mu$  and  $k$  opioid receptor binding in the Parabrachial Nucleus of the rat: A quantitative autoradiographic study. *Brain Research*, 706, 333-336.
- WRIGHT, C. I. AND GROENEWEGEN, H. J. (1996). Patterns of overlap and segregation between Insular Cortical, Intermediodorsal Thalamic and basal amygdaloid afferents in the Nucleus Accumbens of the rat. *Neuroscience*, 73 (2), 359-373.
- WRIGHT, C. I.; MARTIS, B.; MCMULLIN, K.; SHIN, L. M. AND RAUCH, S. L. (2003). Amygdala and Insular responses to emotionally valence human faces in small animal specific phobia. *Biological Psychiatry*, 54, 1067-1076.

- WYVELL, C. L. AND BERRIDGE, K. C. (2001). Incentive sensitization by previous amphetamine exposure: Increased cue-triggered “wanting” for sucrose reward. *The Journal of Neuroscience*, 21 (19), 7831-7840.
- YAMADA, J. AND KITAMURA, T. (1992). Spinal cord cells innervating the bilateral Parabrachial Nuclei in the rat: A retrograde fluorescent double-labeling study. *Neuroscience Research*, 15 (4), 273-280.
- YAMADA, S.; OHSHIMA, T.; ODA, H.; ADACHI, M. AND SATOH, T. (1990). Synchronized discharge of taste neurons recorded simultaneously in rat Parabrachial Nucleus. *Journal of Neurophysiology*, 63 (2) 294-302.
- YAMAMOTO, T. (1993). Neural mechanisms of taste aversion learning. *Neuroscience Research* 16, 181-185.
- YAMAMOTO, T. (1998). Electrophysiology of CTA. En: BURES, J., BERMUDEZ-RATTONI, F. AND YAMAMOTO, T.: *Conditioned taste aversion. Memory of a special kind*. Oxford University Press, pp. 76-91.
- YAMAMOTO, T. (2006). Neural substrates for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain. *Archives of Histology and Cytology*, 69 (4), 243-255.
- YAMAMOTO, T.; AZUMA, S. AND KAWAMURA, Y. (1984). Functional relations between the Cortical Gustatory Area and the Amigdala: Electrophysiological and behavioural studies in rats. *Experimental Brain Research*, 56, 23-31.
- YAMAMOTO, T.; AZUMA, S. AND KAWAMURA, Y. (1981). Significance of cortical amigdalar-hypothalamic connections in retention of conditioned taste aversions in rats. *Experimental Neurology*, 74, 758-768.
- YAMAMOTO, T. AND FUJIMOTO, Y. (1991). Brain mechanisms of taste aversion learning in the rat. *Brain Research Bulletin*, 27, 403-406.
- YAMAMOTO, T.; MATSUO, R. AND KAWAMURA, Y. (1980). Location of cortical gustatory area in rats an its role in taste discrimination. *Journal of Neurophysiology*, 44 (6), 440-455.

- YAMAMOTO, T.; MATSUO, R.; KIYOMITSU, Y. AND KITAMURA, R. (1988a). Sensory inputs from the oral region to the cerebral cortex in behaving rats: An analysis of unit responses in cortical somatosensory and taste areas during ingestive behavior. *Journal of Neurophysiology*, 60, 1303-1321.
- YAMAMOTO, T.; MATSUO, R.; KIYOMITSU, Y. AND KITAMURA, R. (1989). Taste responses of cortical neurons in freely ingesting rats. *Journal of Neurophysiology*, 61 (6), 1244-1258.
- YAMAMOTO, T.; NAGAI, T.; SHIMURA, T. AND YASOSHIMA, Y. (1998). Roles of chemical mediators in the taste system. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 76, 325-348.
- YAMAMOTO, T. AND SAWA, K. (2000a). C-Fos like immunoreactivity in the brainstem following gastric loads of various chemical solutions in rats. *Brain Research*, 866,135-143.
- YAMAMOTO, T. AND SAWA, K. (2000b). Comparison of C-Fos- like immunoreactivity in the brainstem following intraoral and intragastric infusions of chemical solutions in rats. *Brain Research*, 866,144-151.
- YAMAMOTO, T.; SHIMURA, T.; SAKAI, N. AND OZAKI, N. (1994). Representation of hedonics and quality of taste stimuli in the Parabrachial Nucleus of the rat. *Physiology and Behavior*, 56 (6), 1197-1202.
- YAMAMOTO, T.; SHIMURA, T.; SAKO, N.; AZUMA, S.; BAI, W. Z. AND WAKISAKA, S. (1992). C-Fos expression in the rat brain after intraperitoneal injection of Lithium Chloride. *NeuroReport*, 3, 1049-1052.
- YAMAMOTO, T.; SHIMURA, T.; SAKO, N.; SAKAI, N.; TANIMIZU, T. AND WAKISAKA, S. (1993). C-fos expresión in the Parabrachial Nucleus after ingestion of sodium chloride in the rat. *NeuroReport*, 4, 1223-1226.
- YAMAMOTO, T.; YUYAMA, N.; KATO, T. AND KAWAMURA, Y. (1985b). Gustatory responses of cortical neurons in rats: II. Information processing of taste quality. *Journal of Neurophysiology*, 53(6), 1356-1369.

- YAMAMOTO, T.; YUYAMA, N.; KATO, T. AND KAWAMURA, Y. (1985c). Gustatory responses of cortical neurons in rats: III. Neural and Behavioural measures compared. *Journal of Neurophysiology*, 53(6), 1370-1386.
- YASOSHIMA, Y. AND YAMAMOTO, T. (1998). Short-Term and Long-Term excitability changes of the Insular Cortical neurons after the acquisition of taste aversion learning in behaving rats. *Neuroscience*, 84 (1), 1-5.
- YASUI, Y.; ITOH, K.; FAKHOS, M.; MITANI, A.; KANAKO, T. AND MIZUNO, N. (1985). Direct cortical projections to the Parabrachial Nucleus in the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 244, 77-86.
- YEOMANS, J. S. (1982). The cells and axons mediating Medial Forebrain Bundle reward. En: Hoebel, B. G. and Novin, D. (Eds.): *The Neural Basis of Feeding and Reward*, Haer Institute for Electrophysiological Research, pp. 405-418.
- YEOMANS, J. S. (1990). *Principles of Brain Stimulation*, OUP.
- YEOMANS, J. S. AND BAPTISTA, M. (1997). Both nicotinic and muscarinic receptors in Ventral Tegmental Area contribute to brain-stimulation reward. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 57 (4), 915-921.
- YEOMANS, J. S.; MATHUR, A. AND TAMPAKERAS, M. (1993). Rewarding brain stimulation: Role of Tegmental cholinergic neurons that activate Dopamine neurons. *Behavioral Neuroscience*, 107 (6), 1077-1087.
- YEOMANS, M. R. AND GRAY, R. W. (1997). Effects of naltrexone on food intake and changes in subjective appetite during eating: Evidence for opioid involvement in the appetiser effect. *Physiology and Behavior*, 62 (1), 15-21.
- YEOMANS, M. R. AND GRAY, R. W. (2002). Opioid peptides and the control of human behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26: 713-728.
- YOO, J.-H.; YANG, E.-M.; LEE, S.-Y.; LOH, H. H.; HO, I. K. AND JANG, C.-G. (2003). Differential effects of morphine and cocaine on locomotor activity and sensitisation in  $\mu$ -opioid receptor knockout mice. *Neuroscience Letters*, 344, 37-40.

- YOSHIDA, A.; CHEN, K.; MORITANI, M.; YABUTA, N. H.; NAGASE, Y.; TAKEMURA, M. AND SHIGENAGA, Y. (1997). Organisation of the descending projections from the Parabrachial Nucleus to the Trigeminal sensory nuclear complex and Spinal Dorsal Horn in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 383, 94-111.
- YOUNG, A. M. (2004). Increased extracellular dopamine in nucleus Accumbens in response to unconditioned and conditioned aversive stimuli: Studies using 1 min microdialysis in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 138 (1-2), 57-63.
- YOUSFI-MALKI, M. AND PUIZILLOUT, J. J. (1994). Induction of Fos-like protein in neurons of the Medulla Oblongata after electrical stimulation of the Vagus nerve in anesthetized rabbit. *Brain Research*, 635, 317-322.
- YU, W. Z.; SCLAFANI, A.; DELAMATER, A. R. AND BODNAR, R. J. (1999). Pharmacology of flavor preference conditioning in sham-feeding rats: Effects of Naltrexone. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 64 (3), 573-584.
- YUAN, C. S. AND BARBER, W. D. (1991). Parabrachial Nucleus: Neuronal evoked responses to gastric vagal and greater Splanchnic Nerve stimulation. *Brain Research Bulletin*, 27 (6), 797- 803.
- ZÁBORSZKY, L; ALHEID, G. F.; BEINFELD, M. C.; EIDEN, L. E.; HEIMEX, L. AND PALKOVITS, M. (1985). Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: A morphological and radioimmunological study. *Neuroscience*, 14 (2), 427-453.
- ZAFRA, M. A. (2000). *Mecanismos neurobiológicos periféricos y centrales implicados en la Nutrición: Efectos de la administración enteral de nutrientes tras la intervención sobre el eje Vagal-Parabraquial*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España.
- ZAFRA, M. A.; MOLINA, F. AND PUERTO A. (2007). Learned flavor preferences induced by intragastric administration of rewarding nutrients: role of capsaicin-sensitive vagal afferent fibers. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293: R635-R641.

- ZAFRA, M. A.; PRADOS, M.; MOLINA, F. AND PUERTO A. (2006). Capsaicin-sensitive afferent vagal fibres are involved in concurrent taste aversion learning. *Neurobiology Learning and Memory*, 86 (3), 349-52.
- ZAFRA, M. A.; SIMÓN, M. J.; MOLINA, F. AND PUERTO, A. (2002). The role of the External Lateral Parabrachial subnucleus in flavor preferences induced by predigested food administered intragastrically. *Brain Research*, 950 (1-2),155-164.
- ZAHM, D. S. AND BROG, J. S. (1992). On the significance of subterritories in the “accumbens” part of the rat ventral striatum. *Neuroscience*, 50 (4), 751-767.
- ZARRINDAST, M.-R.; REZAYOF, A.; SHARAEI, H.; HAERI-ROHANI, A. AND RASSOULI, Y. (2003). Involvement of dopamine D1 receptors of the central Amygdala on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rat. *Brain Research*, 965, 212-221.
- ZHANG, Z.; DOUGHERTY, P. M. AND OPPENHEIMER, S. M. (1999). Monkey Insular Cortex neurons respond to baroreceptive and somatosensory convergent inputs. *Neuroscience*, 94 (2), 351-360.
- ZHANG, X.; FOGEL, R. AND RENEHAN, W. E. (1992). Physiology and morphology of neurons in the Dorsal Motor Nucleus of the Vagus and the nucleus of the Solitary Tract that are sensitive to distension of the small intestine. *Journal of Comparative Neurology*, 323, 432-448.
- ZHANG, M.; GOSNELL, B. A. AND KELLEY, A. E. (1998). Intake of high-fat food is selectively enhanced by mu opioid receptor stimulation within the Nucleus Accumbens. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 285 (2), 908-914.
- ZHANG, M. AND KELLEY, A. E. (1997). Opiate agonists microinjected into the Nucleus Accumbens enhance sucrose drinking in rats. *Psychopharmacology*, 132, 350-360.
- ZHANG, Z. AND OPPENHEIMER, S. M. (1997). Characterization, distribution and lateralization of baroreceptor-related neurons in the rat Insular Cortex. *Brain Research*, 760, 243-250.

- ZHANG, Z. AND OPPENHEIMER, S. M. (2000). Baroreceptive and somatosensory convergent thalamic neurons project to the posterior Insular Cortex in the rat. *Brain Research*, 861, 241-256.
- ZHOU, Q.; FRÄNDBERG, P.-A.; KINDLUNDH, A. M. S.; LE GREVÈS P. AND NYBERG, F. (2003). Substance P (1–7) affects the expression of dopamine D2 receptor mRNA in male rat brain during morphine withdrawal. *Peptides*, 24 (1), 147-153.
- ZILLES, K. (1990). Anatomy of the neocortex: Neurochemical and myeloarchitecture. En: Kolb, B. and Tees, R. C. (Eds.): *The Cerebral Cortex of the Rat*, The MIT Press, pp.77-112.
- ZITO, K. A.; BECHARA, A.; GREENWOOD, C. AND VAN DER KOOY, D. (1988). The dopamine innervation of the visceral cortex mediates the aversive effects of opiate. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 30, 693-699.